

Entwicklung alternativer Methoden zur Nukleotid- Analytik in der Bioprozeßüberwachung

Von der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig
zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
genehmigte
D i s s e r t a t i o n

von
Tanja Richter
aus Wolfsburg

1. Referentin: Frau PD Dr. U. Bilitewski
2. Referent: Herr Prof. W.-D. Deckwer
eingereicht am: 27. März 2000
mündliche Prüfung (Disputation) am: 5. Juni 2000

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät, vertreten durch die Mentorin der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen:

Lisdat F., Ho W.O., Wollenberger U., Scheller F.W., Richter T. & Bilitewski U.:
Recycling Systems Based on Screen-Printed Electrodes. *Electroanalysis* 10:
803-807 (1998).

Schumacher J.T., Münch I., Richter T., Rohm I. & Bilitewski U.: Investigations with
Respect to Stabilization of Screen-Printed Enzyme Electrodes. *J. Molecular
Catalysis B: Enzymatic* 7: 67-76 (1999).

Tagungsbeiträge:

Richter T., Standfuß-Gabisch C., Shultz-Lockyear L.L., Oleschuk R.D., Harrison D.J.
& Bilitewski U.: Mikrosysteme zur Bestimmung von Xanthin. (Vortrag) 1. Deutsches
Biosensor Symposium, München (1999).

Richter T., Rayner M.H. & Bilitewski U.: Application of Screen-Printed Fructose and
Glucose Sensors to Food Analysis. (Poster) 4th World Congress on Biosensors,
Bangkok (1996).

Richter T. & Bilitewski U.: A Flow Injection Analysis System Using a Bi-Enzyme
Sensor for the Determination of ATP. (Poster) 8th Congress on Biotechnology,
Budapest (1997).

Richter T. & Bilitewski U.: Screen-Printed Electrodes for the Detection of Nucleotides
and Their Metabolites. (Poster) 5th World Congress on Biosensors, Berlin (1998).

Meinen Eltern

*Wer A sagt, muß nicht B sagen.
er kann auch erkennen,
daß A falsch war.*

(Bertold Brecht)

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau PD Dr. Ursula Bilitewski für die Betreuung und ihr stetes Interesse an meiner Arbeit, für ihre Diskussionsbereitschaft, viele Anregungen und die zahlreichen Möglichkeiten zur wissenschaftlichen Entfaltung.

Herrn Prof. Wolf-Dieter Deckwer danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferats.

Ein großer Dank geht an Frau Christine Standfuß-Gabisch für ihre hervorragende Unterstützung bei der Entwicklung der XOD-Reaktoren.

Herrn Prof. D. Jed Harrison danke ich ganz herzlich für die Möglichkeit in seiner Arbeitsgruppe alle Mikrofluidik-Experimente durchführen zu können, für viele interessante Gespräche und wertvolle Hinweise und letztendlich dafür, daß ich einen herrlichen kalten kanadischen Winter erleben konnte.

Dr. Loranelle Shultz-Lockyear, Dr. Richard Oleschuk, Dr. Cameron Skinner, Dr. Fahima Ouchen, Amanda Rahn, Abebaw Jemere und vielen anderen von der University of Alberta danke ich für unkomplizierte und freundschaftliche Unterstützung inner- und außerhalb des Labors, ihre unendliche Geduld bei der Beantwortung meiner vielen Fragen und für eine unvergeßliche Zeit, die ich in Edmonton verbracht habe.

Beim Förderverein der GBF möchte ich mich für die finanzielle Unterstützung des Kanada-Aufenthaltes bedanken.

Bei Frau Dr. Ingrid Rohm, Herrn Dr. Matthias Stiene und Herrn Alexander Günther möchte ich mich für viele anregende Diskussionen und Ratschläge bedanken.

Der *Laborbesatzung* Frau Birgit von Tiedemann und Herrn Adrian Klein gilt mein Dank für die schöne gemeinsam an der GBF verbrachte Zeit.

Herrn Dr. Dirk Kuhlmeier danke ich herzlich für die lange gemeinsame Zeit in und um Braunschweig, seine stete Bereitschaft neue und alte Ideen zu diskutieren, sowie für die kritische Durchsicht des Manuskripts.

Herrn Markus Richter danke ich ebenfalls ganz herzlich für die kritische Durchsicht des Manuskripts sowie für viele kluge und weniger kluge brüderliche, aber sicherlich immer wohlgemeinte Ratschläge.

Ein Dank auch an die Arbeitsgruppe Zellkulturtechnik der GBF und an ihren Drucker, ohne den so manche Folie wahrscheinlich immer noch nicht gedruckt wäre, sowie für ihre Lauf- und Wettfreudigkeit, die das Leben rund um die GBF zwar manchmal anstrengend doch nie uninteressant werden ließ.

Der gesamten Arbeitsgruppe Bioanalytik/Biosensorik der GBF gebührt mein großer Dank für das äußerst freundschaftliche und angenehme Arbeitsklima und die ausgezeichnete Zusammenarbeit.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Zielsetzung	1
1.2 Einführung	2
1.3 Nukleotide in der Bioprozeßüberwachung	3
1.3.1 Grundlagen	3
1.3.2 Adenylate Energy Charge	4
1.3.3 Weitere intrazelluläre Nukleotidpools	5
1.3.4 Extrazelluläre Nukleobasen	6
1.4 Physiologische Bedeutung von ATP und Xanthin	7
1.4.1 Adenosin-5'-triphosphat	7
1.4.2 Xanthin	8
1.5 Analytische Methoden zur Bestimmung von ATP und Xanthin	10
1.5.1 Biosensoren	10
1.5.1.1 Biosensoren zur Detektion von ATP	11
1.5.1.2 Biosensoren zur Xanthin-Detektion	14
1.5.2 Chromatographische Methoden	14
1.5.3 Kapillarelektrophorese (CE)	15
1.6 Mikrosysteme	17
1.6.1 Miniaturisierte totale Analysesysteme (μ TAS)	18
1.6.2 Mikro-Kapillarelektrophorese (μ CE)	19
1.6.2.1 Chip-Materialien	20
1.6.2.2 Detektion	21
2. Material und Methoden	22
2.1 Material	22
2.1.1 Chemikalien	22
2.1.2 Enzyme	23
2.1.3 Verwendete Puffer	23
2.1.4 Glas-Beads	23
2.1.5 Geräte	23
2.1.5.1 Fließinjektionssystem	23
2.1.5.2 Herstellung von Dickschichtsensoren	24

2.1.5.3 Kapillarelektrophorese	24
2.1.5.4 Mikrofluide Systeme	24
2.2 Methoden	25
2.2.1 Dickschichttechnologie	25
2.2.2 Herstellung planarer Elektrodensysteme	28
2.2.3 Enzymimmobilisierung	29
2.2.3.1 Immobilisierung über Glutardialdehyd	29
2.2.3.2 UV-Polymerisation	31
2.2.3.3 Immobilisierung auf Graphitelektroden über Carbodiimid	33
2.2.3.4 Immobilisierung auf GOPS-aktivierte Träger	33
2.2.4 Elektrochemische Detektion	35
2.2.4.1 Amperometrie	35
2.2.4.2 Cyclische Voltametrie	36
2.2.5 Fließinjektionsanalyse	37
2.2.5.1 Enzymatische Detektion in der FIA	37
2.2.5.2 Aufbau des Fließinjektions-Systems	38
2.2.6 Amperometrische Bestimmung von ATP	39
2.2.7 Amperometrische Bestimmung von Xanthin	40
2.2.7.1 XOD-Elektroden	40
2.2.7.2 XOD-Reaktoren	41
2.2.8 Kapillarelektrophorese	41
2.2.8.1 Grundlagen	41
2.2.8.2 Elektroosmotischer Fluß (EOF)	43
2.2.8.3 Detektion	45
2.2.9 Trennung von Xanthin über CE	46
2.2.9.1 UV-Detektion	46
2.2.9.2 Indirekte Laser-induzierte Fluoreszenz-Detektion	46
2.2.10 Mikrosysteme	47
2.2.10.1 Herstellung mikrofluider Strukturen	48
2.2.10.2 Mikrochip-Kapillarelektrophorese	49
2.2.10.3 Injektion und Separation	50
2.2.10.4 Detektion	51
2.2.10.5 Trennung von Xanthin	52
2.2.10.6 Enzymassay	53

2.2.10.7 Kontinuierliches Mikrosysteme	53
2.210.8 Mikrofließsystem mit integriertem Enzymreaktor	54
3. Ergebnisse	56
3.1 Amperometrische Bestimmung von ATP	56
3.1.1 Einfluß der Magnesium-Konzentration	56
3.1.2 Verhältnis der immobilisierten Enzymmengen	58
3.1.3 Glucose-Konzentration	61
3.1.4 Veränderung der Sensoreigenschaften nach Lagerung	63
3.1.5 Bi-Enzymreaktoren	64
3.1.6 HK-Reaktor/GOD-Elektrode	67
3.2 Amperometrische Bestimmung von Xanthin	68
3.2.1 XOD-Platin-Dickschichtelektroden	68
3.2.1.1 Untersuchung unspezifischer Signale	68
3.2.1.2 Einfluß einer BSA-Membran auf das unspezifische Signal	71
3.2.1.3 Stabilität von XOD-UV-Elektroden	73
3.2.1.4 Einfluß von Pastenzusätzen auf die Signalthöhe	76
3.2.2 XOD-Graphit-Dickschichtelektroden	78
3.2.2.1 Untersuchung unspezifischer Signale	78
3.2.2.2 Stabilität von XOD-Graphitelektroden	81
3.2.3 XOD-Reaktoren	82
3.2.3.1 Unterdrückung unspezifischer Signale	83
3.2.3.2 Trägermaterial und Aktivierungsmethode	85
3.2.3.3 Einfluß von EDTA und pH-Wert	87
3.2.3.4 Arbeitsstabilität	89
3.2.3.5 Lagerstabilität	90
3.2.3.6 Einfluß des Mediums	91
3.2.3.7 Bestimmung von Xanthin in Realproben	93
3.2.3.8 Probenahme über Dialysem modul	95
3.2.3.9 Realproben-Bestimmung über Dialysem modul	99
3.3 Trennung von Xanthin mittels Kapillarelektrophorese	102
3.3.1 UV-Detektion	102
3.3.1.1 UV-Detektion von Xanthin	103
3.3.1.2 Separations-Spannung	104
3.3.1.3 Einfluß der Probenzusammensetzung	105

3.3.2 Indirekte LIF-Detektion	109
3.3.2.1 Grundlagen	109
3.3.2.2 Peakspektrum	110
3.3.2.3 Indirekte LIF-Detektion von Xanthin	114
3.3.2.4 Einfluß der Fluorescein-Konzentration	116
3.3.2.5 Elektrolyt-Konzentration	119
3.4 Miniaturisierte Analysesysteme zur Bestimmung von Xanthin	122
3.4.1 Mikro-Kapillarelektrophorese	122
3.4.1.1 Fluorescein-Konzentration	124
3.4.1.2 Separations-Spannung	126
3.4.1.3 Injektionsdauer	128
3.4.1.4 Kalibration	130
3.4.1.5 Einfluß von Glucose	130
3.4.2 Enzymassay im kontinuierlichen μ -Fließsystem	132
3.4.2.1 Optimierung der CL-Reaktion	132
3.4.2.2 Optimierung der Detektorposition	133
3.4.2.3 Homogener Enzymassay	134
3.4.2.4 Heterogener Enzymassay	136
3.4.3 Mikro-Fließsystem mit integriertem Reaktor	139
3.4.3.1 Beladung des Reaktors	139
3.4.3.2 Optimierung der CL-Reaktion	140
3.4.3.3 Optimierung der Fließgeschwindigkeit	143
3.4.3.4 Xanthin-Detektion	143
4. Zusammenfassung und Diskussion	147
4.1 ATP-Sensoren	147
4.1.1 Charakterisierung der GOD/HK-Elektrode	147
4.1.2 Beurteilung gegenüber vergleichbaren ATP-Systemen	149
4.1.3 Beurteilung des ATP-Sensors gegenüber Verstärkungs- und Luciferasesystemen	151
4.1.4 Beurteilung der Eignung des ATP-Systems zur Bioprozeßüber- wachung	153
4.2 Amperometrische XOD-Sensoren	154
4.2.1 XOD-Platinelektroden	154
4.2.2 XOD-Graphitelektroden	155

4.2.3 XOD-Reaktoren	156
4.2.4 Vergleichende Betrachtung mit weiteren Xanthin-Systemen	158
4.3 Elektrophoretische Untersuchungen Xanthin-haltiger Proben	159
4.4 Mikrofluide Systeme zur Xanthin-Bestimmung	160
4.4.1 Mikro-Kapillarelektrophorese	160
4.4.2 Mikro-Fließsystem	161
4.4.3 Integrierter Enzymreaktor	163
4.4.4 Beurteilung der Eignung mikrofluider Systeme zur Xanthin-Bestimmung	163
5. Literatur	165

Abkürzungsindex

ADP	Adenosindiphosphat
AEC	Adenylate Energy Charge
AMP	Adenosinmonophosphat
APTS	Aminopropyltriethoxysilan
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
AU	Arbitrary Units
BSA	Rinderserum Albumin
CE	Kapillarelektrophorese
CL	Chemilumineszenz
CPG	controlled pore glass
CTP	Cytidintriphosphat
CV	Cyclische Voltametrie
CZE	Kapillarzonenelektrophorese
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDC	Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EOF	elektroosmotischer Fluß
FAD	Flavinadenindinukleotid
FIA	Fließinjektions-Analyse
GA	Glutardialdehyd
GOD	Glucose-Oxidase
GOPS	3-Glycidoxypropylmethoxysilan
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde(n)
HK	Hexokinase
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography
IMP	Inosinmonophosphat
KPP	Kaliumphosphat-Puffer
LIF	Laser-induzierte Fluoreszenz
MEKC	micellare elektrokinetische Chromatographie
min	Minute(n)
µCE	mikro-Kapillarelektrophorese

μTAS	miniaturisiertes totales Analysesystem
NAD	Nicotinamidadeninnukleotid
NTP	Nukleotidtriphosphat
PDMS	Polydimethylsiloxan
P _i	Orthophosphat
PMT	Photomultipliertube
POCRE	Post Column Reaction
POD	Peroxidase
RCC	Reaction Chamber for Cells
RNA	Ribonukleinsäure
RP	Reversed Phase
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)
T	Temperatur
TAS	totales Analysesystem
UDP	Uridindiphosphat
UDP-GalNAc	UDP-N-Acetyl-Galactosamin
UDP-GlcNAc	UDP-N-Acetyl-Glucosamin
UTP	Uridintriphosphat
V	Volt
v/v %	Volumenprozent
w _{1/2}	Peakbreite auf halber Höhe
XOD	Xanthin-Oxidase

1. Einleitung

1.1 Zielsetzung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten alternative Methoden zur bisher zur Bioprozeßüberwachung durchgeführten HPLC-Nukleotidanalytik etabliert werden, so daß eine on-line Überwachung über die Bestimmung relevanter Einzelparameter möglich und die Analysendauer deutlich verkürzt wird.

Als alternative Methoden sollten vor allem enzymatische und elektrophoretische Prinzipien eingesetzt werden. Da nur für wenige der Nukleotide, die sich chromatographisch trennen lassen, enzymatische Detektionsmethoden zur Verfügung stehen, wurden die Untersuchungen anhand von zwei Analyten durchgeführt: zum einen wurde Xanthin ausgewählt, das als Einzelsubstanz eine direkte Kopplung mit dem Zellwachstum zeigte und zudem extrazellulär im Medium vorlag (Kap. 1.3.4), und zum anderen Adenosin-5'-triphosphat (ATP) als intrazelluläre Komponente, das zwar nur indirekt über den Adenylate Energy Charge (Kap. 1.3.2) Wechselwirkungen mit dem Wachstumsverhalten zeigte, als Speicherform der freien Energie aber eines der wichtigsten Nukleotide darstellt. *ATP-Systeme* könnten daher nur in Verbindung mit einem geeigneten Zellaufschlußverfahren eingesetzt werden, während *Xanthin-Systeme* über etablierte Probenahmemodule an Prozesse angekoppelt werden könnten.

Die Basis zur Entwicklung geeigneter Detektionssysteme stellten zunächst amperometrische Biosensoren dar (Kap. 1.5.1), die anschließend in ein bereits etabliertes Fließinjektions-System integriert wurden. Darüber hinaus hatte die Arbeit zum Ziel, alternative Methoden zur Bestimmung von Xanthin unter Berücksichtigung elektrophoretischer Trennverfahren zu entwickeln (Kap. 1.5.3). Da jedoch für diese Methoden auch immer das Kriterium gelten mußte, daß sie ohne großen technischen Aufwand an einen Bioreaktor koppelbar sein sollten und sich dies mit kommerziellen CE-Instrumenten nicht ohne weiteres umsetzen ließ, wurde die Trennung auf miniaturisierte CE-Systeme übertragen (Kap. 1.6), die über ihr Netzwerk aus Mikrokanälen eine Verbindung mit der *Außenwelt* gewährleisten. Als weitere Vorteile bei der Nutzung dieser Systeme ergeben sich ein reduzierter Platzbedarf der prozeßbegleitenden Analytik sowie ein herabgesetzter Reagenzienverbrauch und Probenbedarf. Über letzteres sollte damit auch die kontinuierliche Überwachung der

häufig im kleinen Maßstab durchgeführten Forschungsfermentationen gewährleistet werden.

1.2 Einführung

Die Anzahl der im industriellen Maßstab durchgeführten Fermentationen zur Herstellung pharmazeutischer und anderer Produkte ist in den letzten Jahren stark angestiegen. Um diese Prozesse gerade im Hinblick auf Produktausbeute, Reproduzierbarkeit und natürlich auch Wirtschaftlichkeit effizient betreiben zu können, wird eine ständige Überwachung der Kultivierungen zur Beurteilung des Zustandes der Zellen notwendig. Eine solche Kontrolle läßt sich über die Bestimmung physikalischer, chemischer und biologischer Parameter erreichen (Pons, 1991; Scheper, 1991; Bilitewski und Rohm, 1997). Für die Erfassung physikalischer und chemischer Kenngrößen wie Temperatur, pH-Wert, Sauerstoffpartialdruck, Abgaszusammensetzung und Rührergeschwindigkeit werden bereits kommerzielle Meßsysteme angeboten, die unabhängig von der Art der Zellen und vom Kultivierungsmodus eingesetzt werden können. Als biologische Schlüsselkomponenten dienen im allgemeinen die Mediumkonzentrationen bestimmter Nährstoffe (Glucose), Metabolite (Lactat) und essentieller Aminosäuren wie Glutamin (Rohm, 1996). Für die Kontrolle eines Bioprozesses reicht jedoch eine Analyse dieser extrazellulär vorliegenden Substanzen nicht aus, sondern für eine Beurteilung des Zellzustandes und eindeutige Charakterisierung der Wachstumsphase müssen weitere Parameter zusätzlich erfaßt werden (Büntemeyer *et al.*, 1991). In der Regel läßt es sich nicht vermeiden, für jeden Zelltyp und unter Umständen auch für jeden Produktionsprozeß ein Optimierungsprogramm zu durchlaufen, um das Medium auf Zelltyp und Kultivierungsmodus abzustimmen. Dies ist in den meisten Fällen nötig, da eine Definition von Leitparametern, die unabhängig von der Art der Zellen und ihren ernährungsphysiologischen Bedürfnissen, vom Reaktortyp und Kultivierungsmodus eine klare Beurteilung des Zustandes der Zellen zulassen, über die Bestimmung von Nährstoff- und Metabolitkonzentrationen nur sehr schwer möglich ist. Aus diesem Grund nimmt das Interesse an der Analyse intrazellulärer Substanzklassen zur Bioprozeßkontrolle zu, da man gerade von Parametern, die im Primärstoffwechsel von Bedeutung sind, eine größere Konservativität erwartet, d. h. daß sie unabhängig von der Art der

Störung des Systems mit einer eindeutigen Reaktion diesen ungünstigen Zustand anzeigen.

1.3 Nukleotide in der Bioprozeßüberwachung

1.3.1 Grundlagen

Nukleotide zählen zu einer der wichtigsten Substanzklassen in zellulären Systemen, da sie bei fast allen biochemischen Prozessen eine Schlüsselfunktion einnehmen. Sie sind Bestandteile der Nukleinsäuren (DNA, RNA) dienen aber außerdem als metabolische Regulatoren vieler Stoffwechselwege, als Energielieferanten für Biosynthesen und Transportprozesse, als Modulatoren von Enzymaktivitäten und sind Bestandteile wichtiger Coenzyme wie NAD, FAD und CoA.

Nukleotide setzen sich aus einer stickstoffhaltigen Base, einem Zucker und Phosphatresten zusammen. Bei den Nukleinsäurebasen handelt es sich um aromatische Heterocyklen, die sich entweder vom Pyrimidin oder Purin ableiten. Fünf Derivate dieser Basen sind als Hauptkomponenten der Nukleinsäuren allen Lebewesen gemeinsam, wobei Adenin und Guanin als Purin-Abkömmlinge genau wie das Pyrimidin-Derivat Cytosin sowohl in der DNA als auch in der RNA vorkommen. Dagegen findet sich Uracil nur in der RNA und wird in der DNA durch das 5-Methyl-Derivat Thymin ersetzt. Durch die Verknüpfung einer Base mit einer Pentose (Ribose oder Desoxyribose) erhält man ein Nukleosid, das über eine Veresterung an der 5'-Hydroxylgruppe der Zuckerkomponente mittels Phosphorsäure in das entsprechende Nukleosidmonophosphat überführt werden kann. Wird der 5'-Phosphatrest über Säureanhydridbindungen mit weiteren Phosphatgruppen verknüpft, entstehen Nukleosiddi- und -triphosphate. Unter dem Begriff Nukleotid werden allgemein alle Nukleosidphosphate zusammengefaßt.

Da die Konzentrationsänderung eines Nukleotids aufgrund von Gleichgewichtsreaktionen häufig Auswirkungen auf die Konzentration eines oder mehrerer anderer Nukleotide zur Folge hat, definiert man verschiedene Pools, in denen Nukleotide mit gleicher Base oder aber gleicher Phosphatrest-Anzahl zusammengefaßt sind, wie z. B. im Adenylat- (Kap. 1.3.2) oder NTP-Pool (Kap. 1.3.3).

Aufgrund ihrer zentralen Bedeutung im Zellstoffwechsel beeinflussen Änderungen in den Nukleotidpools Transportprozesse, die Synthese von Makromolekülen und damit

auch das Zellwachstum. Mehrere Autoren haben beschrieben, daß sich das Wachstumsverhalten pflanzlicher und tierischer Zellen über die Bestimmung verschiedener intrazellulärer Nukleotidpools kontrollieren läßt (Meyer und Wagner, 1985; Ryll und Wagner, 1992). Diese Zusammenhänge wurden bei Untersuchungen mit Prokaryonten (*Escherichia coli*) nicht wieder gefunden, jedoch änderten sich die extrazellulären Konzentrationen der Nukleobasen Uracil und Xanthin mit dem Wachstumsverhalten dieser Zellen (Rinas *et al.*, 1995).

1.3.2 Adenylate Energy Charge (AEC)

Der 1967 von Atkinson und Walton eingeführte dimensionslose Adenylate Energy Charge (AEC), der auch als Energieladung der Zelle bezeichnet wird, spiegelt die Phosphatbeladung des Adenylatpools wieder:

$$\text{AEC} = \frac{(\text{ATP} + 0,5 \cdot \text{ADP})}{(\text{ATP} + \text{ADP} + \text{AMP})} \quad (1)$$

(ATP: Adenosintriphosphat; ADP: Adenosindiphosphat; AMP: Adenosinmonophosphat)

Eine Kopplung dieser Poolgröße mit dem Wachstumsverhalten wurde bei *Escherichia coli*-Kultivierungen nachgewiesen (Ryll, 1992). So konnte die exponentielle Wachstumsphase durch eine konstante Energieverfügbarkeit charakterisiert werden, die bei höheren Zelldichten und bei Substratlimitierung abnahm. Wurde die Wachstumsrate anschließend gesteuert, konnte die Energieladung wieder regeneriert werden, wodurch sich die Umstellung der Zellphysiologie auf die veränderten Kulturbedingungen verdeutlichte. Ergebnisse früherer Untersuchungen führten zu der Vermutung, daß Zellen mit einer Energieladung von weniger als 0,5 nicht lebensfähig sind (Chapman *et al.*, 1971). Jedoch wurde später diese Annahme widerlegt, indem bewiesen wurde, daß Zellen mit AEC-Werten bis hinunter zu 0,1 bei geeigneten Kultivierungsbedingungen noch regenerierbar waren (Barrette *et al.*, 1988). Ein Grenzwert des AEC, bei dessen Unterschreitung die Zellen nicht weiter lebensfähig sind, wurde jedoch nicht genauer definiert.

1.3.3 Weitere intrazelluläre Nukleotidpools

Durch Untersuchungen vor allem an tierischen Zellkulturen wurden Zusammenhänge zwischen dem Zellwachstum und der Größe von drei ebenfalls dimensionslosen intrazellulären Nukleotidpools nachgewiesen (Ryll, 1992). In einem dieser Pools werden die Konzentrationen der Purin- und Pyrimidintriphosphate folgendermaßen verknüpft:

$$\text{NTP – Wert} = \frac{(\text{ATP} + \text{GTP})}{(\text{UTP} + \text{CTP})} \quad (2)$$

(GTP: Guanosintriphosphat; UTP: Uridintriphosphat; CTP: Cytidintriphosphat)

Der zweite Parameter, der sich im Verlauf einer Kultivierung dem NTP-Wert genau entgegengesetzt entwickelte, gibt das Verhältnis zwischen Uridintriphosphat (UTP) und den beiden Uridindiphosphat (UDP) aktivierten Hexosaminen UDP-N-Acetyl-Galactosamin (UDP-GalNAc) und UDP-N-Acetyl-Glucosamin (UDP-GlcNAc) wieder:

$$\text{U – Wert} = \frac{\text{UTP}}{(\text{UDP – GalNAc} + \text{UDP – GlcNAc})} \quad (3)$$

Aufgrund der schon erwähnten Gegenläufigkeit der beiden Parameter wurde der NTP/U-Wert etabliert, der die numerischen Änderungen der Poolgrößen während verschiedener Wachstumsphasen noch deutlicher hervorhob. Die lag-Phase wurde demnach durch eine Abnahme des NTP/U-Wertes charakterisiert, während er in der log-Phase vergleichsweise konstant blieb und wieder steil anstieg, als das Zellwachstum gedrosselt wurde. Gegen Ende einer Kultivierung sank der Parameter nochmals ab. Wie Untersuchungen an verschiedenen Zelllinien zeigten, war die Kopplung der drei Parameter an das Wachstumsverhalten universell. Es wurden lediglich zellspezifische Werte eingehalten, der beschriebene allgemeine Verlauf blieb gleich und wurde weder von limitierenden/inhibierenden Komponenten noch von der Kultivierungsweise beeinflusst. Darüber hinaus konnte eine Änderung der Zellphysiologie über die Nukleotidpool-Bestimmung ein bis zwei Tage früher festgestellt werden als über die Vitalität mittels Zellzählung oder eine Änderung der

Wachstumsrate (Ryll, 1992). Besonders in Hinblick auf die Produktqualität kann eine frühzeitigere Erkennung einer Zustandsänderung der Zellen von entscheidender Bedeutung sein.

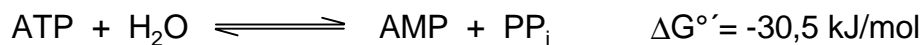
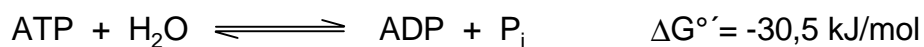
1.3.4 Extrazelluläre Nukleobasen

Ein Zusammenhang zwischen den Konzentrationen extrazellulärer Nukleobasen wie Xanthin und Uracil und dem Wachstumsverhalten von Zellen wurde bei Hochzell-dichte-Kultivierungen von *Escherichia coli* entdeckt (Rinas *et al.*, 1995). Durch die Limitierung eines Medienbestandteiles - in der Regel der Kohlenstoffquelle - kam es zum Übergang von der exponentiellen in die stationäre Wachstumsphase. Gekoppelt an diese metabolische Streßsituation war stets die Akkumulation von Xanthin und Uracil im Medium. Als Ursprung hierfür wurde der Abbau ribosomaler RNA nachgewiesen (Kaplan *et al.*, 1975) und nicht die Freisetzung instabiler Zellbestandteile. Für Uracil konnte gezeigt werden, daß besonders in der späten stationären Wachstumsphase die extrazelluläre Basenkonzentration bedeutend größer war als die Summe instabiler uracilhaltiger Zellbestandteile wie z. B. mRNA, UMP, UDT, UTP, UDP-Glucose und UDP-Galactose (Rinas *et al.*, 1995). Bei einer vollständigen Degradation der Ribosomen müssen neben Uracil auch Cytosin und die beiden Purinbasen Adenin und Guanin freigesetzt werden. Da Uracil die erste Zwischenstufe des Cytosin-Abbaus darstellt, wurden bei den bisherigen Untersuchungen zur Bestimmung der extrazellulären Uracil-Konzentration stets die Summe aus dem direkt freigesetzten und dem über den Cytosin-Abbauweg gebildeten Uracil erfaßt (Seeger, 1995). Adenin und Guanin wurden über das Zwischenprodukt Xanthin abgebaut, das neben Uracil unter substratlimitierten Bedingungen bei *E.coli*-Fermentationen im Medium nachgewiesen wurde (Rinas *et al.*, 1995). Zusammenfassend konnte die Degradation der rRNA bzw. die Akkumulation ihrer Abbauprodukte im Medium als ein Signal für die Reaktion der Zellen auf Streß betrachtet werden, die stets mit einer Änderung der Zellphysiologie verbunden war.

1.4 Physiologische Bedeutung von ATP und Xanthin

1.4.1 Adenosin -5'-triphosphat

Adenosin-5'-triphosphat (ATP) stellt die wichtigste zelluläre Speicherform chemischer Energie dar. Lebende Systeme benötigen die Zufuhr freier Energie, um endergone Vorgänge wie Biosynthesen, Bewegungs- und Transportprozesse durchführen zu können. Die Energieaufnahme erfolgt bei chemotrophen Organismen durch die Oxidation von Nahrungsstoffen, während phototrophe Organismen Lichtenergie umwandeln. ATP wurde als spezieller Träger eines Teils der so gewonnenen freien Energie 1941 von Lipmann und Kalckar entdeckt. Das aus Adenin, Ribose und einer Triphosphat-Einheit aufgebaute Nukleotid tritt in seiner aktiven Form gewöhnlich als Komplex mit Magnesium- oder Manganionen auf. ATP dient als energetische Speicherform, da die Spaltung der Phosphorsäureanhydridbindungen stark exergon verläuft. Die bei der ATP-Hydrolyse gewonnene freie Energie wird zum Antrieb von Reaktionen genutzt, die eine Zufuhr freier Energie benötigen.



Die Änderung der freien Enthalpie $\Delta G^{\circ'}$ beträgt unter Standardbedingungen -30 bis -35 kJ/mol, wobei die Art der im ATP gespaltenen Bindung nur geringen Einfluß auf diesen Wert hat. Man vermutet, daß in der Zelle die Änderung der freien Enthalpie $\Delta G'$ der ATP-Hydrolyse mit etwa -50 kJ/mol noch viel höher liegt, da der Wert dieser Reaktion von der Ionenstärke des Mediums und von der Konzentration der Magnesium- und Calciumionen abhängt (Koolman und Röhm, 1994). Der ATP/ADP-Cyclus stellt den Mechanismus des Energieaustausches in biologischen Systemen dar, indem die Hydrolyse von ATP Energie zur Verfügung stellt, während durch die Oxidation von Nährstoffen oder die Aufnahme von Licht ATP aus ADP und Orthophosphat (P_i) regeneriert wird.

1.4.2 Xanthin

Die Nukleobase Xanthin wird als Zwischenprodukt beim Abbau des ATPs gebildet. Nukleotide gehören allgemein zu den komplexesten Metaboliten, deren Biosynthese langwierig und mit einem hohen Energieaufwand verbunden ist. Aus diesem Grund werden sie nicht vollständig abgebaut, sondern zum großen Teil wiederverwertet. Dies trifft vor allem auf die Purinbasen Adenin und Guanin zu, die im tierischen Organismus zu etwa 90% enzymatisch mit Phosphoribosyldiphosphat wieder zu Nukleosidmonophosphaten aufgebaut werden. ATP wird als Purin-Nukleotid im menschlichen Organismus zu Harnsäure abgebaut und in dieser Form ausgeschieden, wobei der Heterocyclus der Base intakt bleibt. ATP wird zunächst zum Monophosphat hydrolysiert und anschließend durch die Adenylat-Desaminase zu Inosinmonophosphat (IMP) desaminiert (Abb. 1). IMP wird durch die hydrolytische Entfernung der 5'-Phosphatgruppe und der durch Orthophosphat eingeleiteten Spaltung der glycosidischen Bindung in die Nukleobase Hypoxanthin überführt. Die Xanthin-Oxidase (XOD) oxidiert Hypoxanthin anschließend zu Xanthin und weiter zu Harnsäure. Auch die zweite Purinbase Guanin wird über einen vergleichbaren Mechanismus und die Zwischenprodukte Hypoxanthin und Xanthin zu Harnsäure metabolisiert. Im Unterschied zu Vögeln und auch zu den Primaten sind alle anderen Säugetiere in der Lage, Harnsäure mit Hilfe der Uricase unter Ringöffnung weiter zu Allantoin abzubauen und dieses auszuschcheiden. Bei den meisten anderen Tieren wie den Amphibien und Fischen wird der Purin-Abbau noch weiter fortgesetzt, indem Allantoin zu Harnstoff und Glyoxylat zerlegt wird.

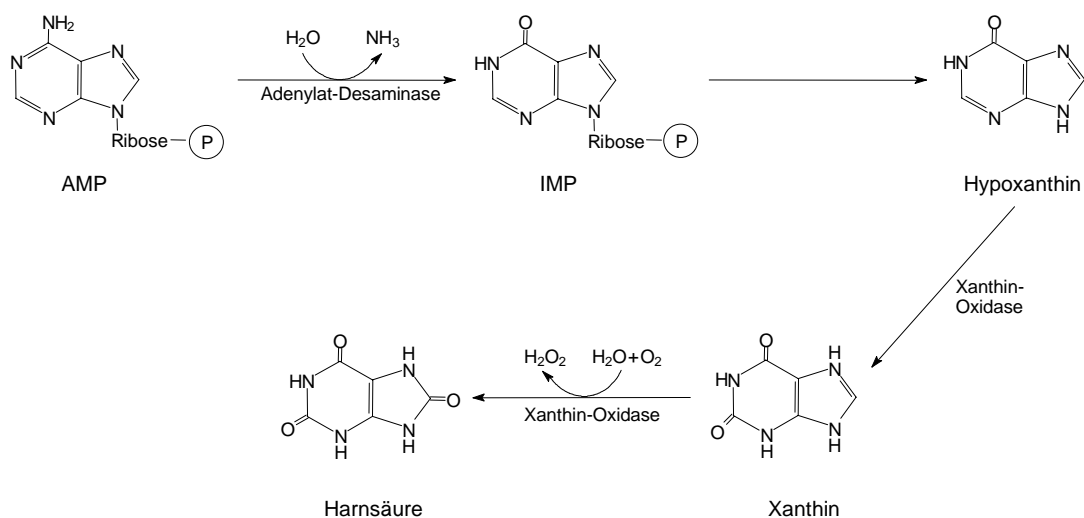


Abb. 1: Abbau von Adenosinmonophosphat zu Harnsäure

Als Zwischenprodukt des Purinnukleotid-Abbaus kommt Xanthin in der klinischen Diagnostik eine wichtige Bedeutung bei der Behandlung von Gicht zu. Die Tatsache, daß die Purin-Nukleotide vom Menschen lediglich bis zur Harnsäure abgebaut werden, kann zu Problemen führen, da sie im Gegensatz zu Allantoin nur schlecht wasserlöslich ist. Daher kann es bei einer gestörten Ausscheidung über die Niere, durch den Verzehr stark purinhaltiger Nahrung (z. B. Fleisch) oder aber durch einen Mangel an Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HGPRT) zu einer übermäßig erhöhten Harnsäure-Konzentration im Blut kommen (Koolman und Röhm, 1994). Das Enzym HGPRT katalysiert die Synthese von Hypoxanthin und Phosphoribosyldiphosphat (PRPP) zu IMP über den Wiederverwertungsweg (*salvage-Synthese*). Über diese Route können Purin-Nukleotide einfacher und viel weniger aufwendig zurückgewonnen werden als über einen *de-novo-Aufbau*. Der HGPRT-Mangel führt somit dazu, daß Hypoxanthin nicht wiederverwertet, sondern lediglich über die Xanthin-Oxidase abgebaut wird. Die daraus resultierende erhöhte Harnsäure-Konzentration im Blut wird als Hyperuricämie bezeichnet und hat die Ablagerung von Harnsäure-Kristallen zur Folge. Diese Ablagerungen in den Gelenken wiederum sind die Ursache der sehr schmerzhaften Gicht-Anfälle. Zur Behandlung von Hyperuricämie eignet sich Allopurinol, ein Analogon des Hypoxanthins. Es wird von der Xanthin-Oxidase als Substrat akzeptiert und zu Alloxanthin hydroxyliert, das sich anschließend jedoch nicht von dem Enzym löst, sondern fest an das aktive Zentrum gebunden bleibt und es damit inhibiert. Die Harnsäuresynthese nimmt aus diesem Grund sehr bald nach der Verabreichung von Allopurinol ab, und gleichzeitig steigt die Serumkonzentration von Hypoxanthin und Xanthin an. Der Erfolg der Behandlung kann also über die Höhe des Xanthin-Spiegels im Serum verfolgt werden (Stryer, 1990).

Die Bedeutung der Wiederverwertung der Purin-Basen zeigt sich auch in den Folgen des *Lesch-Nyhan-Syndroms*. Bei dieser geschlechtsgebunden rezessiv vererbten Krankheit werden durch ein fast vollständiges Fehlen der Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase Gicht und schwere neurologische Störungen durch eine Harnsäure-Überproduktion hervorgerufen, da es zu einem verminderten Wiederaufbau von IMP über Hypoxanthin kommt. Der Zusammenhang zwischen dem Fehlen des Enzyms und den schweren neurologischen Störungen konnte jedoch noch nicht aufgeklärt werden.

Neben der Überprüfung einer erfolgreichen Gicht-Behandlung über eine Bestimmung der Xanthin-Konzentration in Serum zählt die Lebensmittelanalytik zu einem weiteren Gebiet, auf dem Xanthin einen wichtigen Analyten darstellt, da über ihn eine Beurteilung der Frische und Qualität von Fischfleisch möglich ist (Quiong *et al.*, 1998). Der Abbau der Energiequelle ATP setzt automatisch unmittelbar nach dem Tod des Fisches ein. Mit zunehmender Lagerungsdauer tritt eine Akkumulation von Xanthin und Hypoxanthin ein, da die Reaktion der Xanthin-Oxidase im Vergleich zu weiteren an der Metabolisierung des ATPs beteiligten Enzymen mit der geringsten Geschwindigkeit abläuft (Hu und Liu, 1997). Über die Quantifizierung der Konzentration einer der beiden Nukleobasen kann die Qualität des Lebensmittels beurteilt werden.

1.5 Analytische Methoden zur Bestimmung von ATP und Xanthin

1.5.1 Biosensoren

Das Prinzip der Biosensorik basiert auf der spezifischen Erkennung eines Analyten durch eine selektive Biokomponente (z. B. Enzyme, Antikörper oder Ribonukleinsäuren). Unter dem Begriff Biosensor wird hierbei die Kombination der Biokomponente mit einem chemischen oder physikalischen Sensor (Transducer) verstanden, der das biologische Signal in ein elektrisches umwandelt. Die Selektivität des Biosensors wird dabei von der Spezifität der eingesetzten Erkennungskomponente bestimmt, während seine Sensitivität vom Transducer abhängt (Bilitewski, 1995).

Biosensoren lassen sich grundsätzlich in zwei Hauptgruppen unterteilen. Zur Klasse der Metabolismus-Sensoren zählt man alle Testsysteme, in denen der Analyt konvertiert und seine Quantifizierung über die Zunahme eines Reaktionsproduktes bzw. die Abnahme eines Eduktes erfolgt. Die zweite mit dem Begriff Affinitätssensoren bezeichnete Gruppe umfaßt Systeme, mit denen die Bindung des Analyten an die Biokomponente, z. B. die Anlagerung von Proteinen an Antikörper auf einer Sensoroberfläche, über die Änderung physikalischer Parameter verfolgt werden kann. Hierzu rechnet man Surface-Plasmon-Resonance-Sensoren (SPR), Gitterkoppler und weitere Systeme, deren Arbeitsprinzip auf der Totalreflexion von

Licht in einem Wellenleiter beruht (Lawrence und Geddes, 1997; Kooyman und Lechuga, 1997).

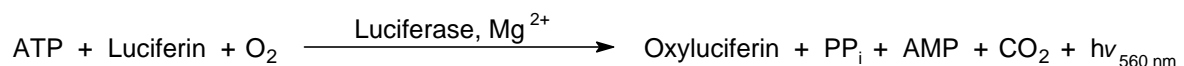
Unter der klassischen Definition eines Biosensors werden im strengen Sinne lediglich solche Systeme erfaßt, in denen die Biokomponente in unmittelbarer Nähe zum Transducer immobilisiert ist (Caman *et al.*, 1991). In allgemeineren Definitionen wird auch eine räumliche Trennung akzeptiert, z. B. wenn eine Immobilisierung des Erkennungssystems auf dem gewählten Detektor nicht möglich ist. Ihre wichtigsten Einsatzgebiete finden Biosensoren in der klinischen Diagnostik (Wang, 1995), der Lebensmittel- und Umweltanalytik (Wagner und Guilbault, 1994; Schmid *et al.*, 1991) sowie in der Bioprozeßüberwachung (Mulchandani und Bassi, 1995).

1.5.1.1 Biosensoren zur Detektion von ATP

In der Literatur sind Biosensorsysteme zur Bestimmung von ATP und Xanthin beschrieben, die als selektive Biokomponenten hauptsächlich Enzyme nutzen. Für einen kontinuierlichen Einsatz werden die Enzyme an verschiedene feste Träger immobilisiert, um im Idealfall die spezifische Detektion ohne die Zugabe weiterer Reagenzien zu ermöglichen, wobei es sich bei dem Träger um die Oberfläche des Transducers oder aber andere Materialien wie z. B. kleine poröse Glaskugeln handeln kann.

Luciferin/Luciferase-System

ATP läßt sich mit Hilfe des Luciferin/Luciferase-Systems bestimmen:

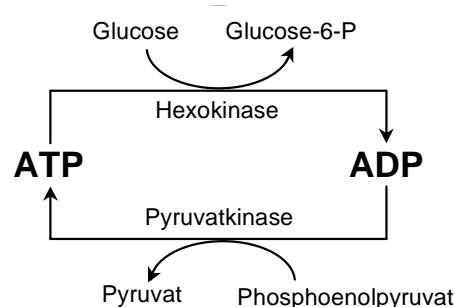


In dieser von der Luciferase katalysierten Reaktion wird Luciferin unter ATP-Hydrolyse zunächst zu einem angeregten Oxyluciferin umgesetzt, das anschließend unter Emission eines Photons in den Grundzustand zurückkehrt. Im Bereich der Biosensorik gehört das Luciferin/Luciferase-System zur sensitivsten ATP-Detektionsmethode, mit der bereits Nachweisgrenzen von 10 fM erzielt wurden (Miller *et al.*,

1992). In der Literatur sind Systeme beschrieben, die zur ATP-Bestimmung lösliche oder an Membranen immobilisierte Luciferase und Photometer bzw. optische Fasern als Detektoren nutzen (Blum *et al.*, 1985 und 1993; Hollnagel, 1998).

Enzymatische Verstärkungssysteme

Diese enzymatischen Systeme, die auf einem Recycling des Analyten basieren, kommen hauptsächlich zur Anwendung, wenn der Analyt in sehr geringen Konzentrationen vorliegt. Bei der Bestimmung von ATP über das Enzympaar Hexokinase/Pyruvatkinase, katalysiert das eine Enzym die Regeneration des Substrates für die zweite Enzymreaktion. Als Folge dieses Kreislaufs wird eine größere Menge der beiden Cosubstrate Glucose und Phosphoenolpyruvat verbraucht bzw. der Produkte Glucose-6-Phosphat und Pyruvat gebildet. Die Produktakkumulation wird zur Quantifizierung des ATPs durch Kopplung mit einer dritten enzymatischen Reaktion genutzt, wobei verschiedene Detektionsprinzipien eingesetzt werden können. So ist die amperometrische Detektion von Pyruvat über das Lactatdehydrogenase/Lactatmonooxygenase-System (Wollenberger *et al.*, 1987) möglich, Glucose-6-Phosphat kann durch die Integration der Glucose-6-Phosphatdehydrogenase zur ATP-Bestimmung herangezogen werden (Yang *et al.*, 1991). Letztere Reaktion kann auch optisch über die NADH-Fluoreszenz verfolgt werden (Schubert, 1993).

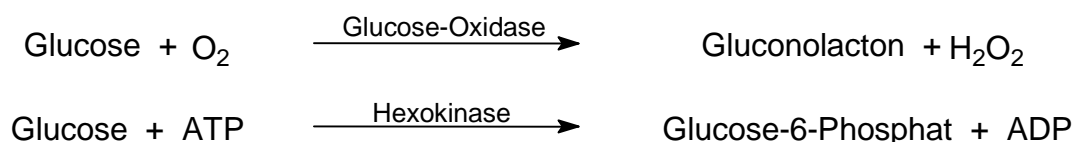


In Abhängigkeit von der Detektionsmethode können über enzymatische Verstärkungssysteme für ATP Detektionslimits von bis zu 1 nM erreicht werden (elektrochemische Oxidation von NADH, Yang *et al.*, 1991). Als nachteilig erweist sich bei dieser Methode die Anzahl der beteiligten Enzyme, die sich durch die dritte gekoppelte Detektionsreaktion auf mindestens drei, in manchen Fällen sogar auf vier erhöhen kann. Daher müssen mit diesen Systemen im Vorfeld zeitaufwendige

Untersuchungen durchgeführt werden, um die Reaktionsbedingungen zu finden, unter denen alle beteiligten Enzyme eine möglichst optimale Aktivität und Stabilität aufweisen. Als weiterer Nachteil erweist sich die für alle Detektionsreaktionen erforderliche Anwesenheit des Coenzym NADH bzw. NAD^+ , das im Gegensatz zu ATP nicht wiedergewonnen wird und somit die Kosten für die Analyse deutlich erhöht.

Glucose-Oxidase/Hexokinase-System

In diesem Fall handelt es sich um einen indirekten Nachweis auf der Basis der um das Substrat Glucose konkurrierenden Reaktionen der Glucose-Oxidase (GOD) und Hexokinase (HK). Durch die Umsetzung des Kohlenhydrats mittels Glucose-Oxidase und der amperometrischen Detektion des Produktes H_2O_2 entsteht ein hohes Grundsignal, das in Abwesenheit von ATP durch die Hexokinase-Reaktion nicht beeinträchtigt wird. Liegt jedoch ATP in der Probe vor, kommt es zu einer Konkurrenz beider Enzyme um das Substrat, woraus eine Verringerung des Grundsignals resultiert. Mittels Differenzbildung läßt sich ATP anschließend quantifizieren (Compagnone und Guilbault, 1997).

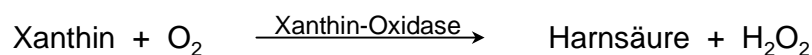


Für die ATP-Bestimmung mit Hilfe des Glucose-Oxidase/Hexokinase-Systems ist ein Detektionslimit von 10 μM beschrieben (Compagnone und Guilbault, 1997). Im Vergleich mit den beiden zuvor vorgestellten Methoden weist dieser ATP-Nachweis somit die geringste Empfindlichkeit auf. Jedoch zeigt sich dieses System unter dem finanziellen Gesichtspunkt als eindeutig überlegen, da es sich hierbei um verglichen mit der Luciferase kostengünstige Enzyme handelt, die ohne nennenswerten Aktivitätsverlust auch co-immobilisiert werden können. Die ATP-Analyse über das Glucose-Oxidase/Hexokinase-System erfordert darüber hinaus neben Glucose lediglich Magnesium als Cosubstrat und kann ohne den Zusatz weiterer Coenzyme durchgeführt werden.

Für den Prokaryonten *E. coli* wurden intrazelluläre ATP-Konzentrationen von 3 – 10 µmol/g Biotrockenmasse beobachtet (Chapman und Atkinson, 1977), so daß die Sensitivität des GOD/HK-Systems möglicherweise ausreicht, um das Nukleotid bei entsprechenden Zelldichten in Realproben bestimmen zu können.

1.5.1.2 Biosensoren zur Xanthin-Detektion

Die meisten Biosensorsysteme zur Bestimmung von Xanthin enthalten Xanthin-Oxidase (XOD) als biologisch aktive Komponente. Die Detektion erfolgt in der Regel elektrochemisch, über die Bestimmung der Reaktionsprodukte Harnsäure (Gonzalez *et al.*, 1991; Zhao *et al.*, 1996), Wasserstoffperoxid (Rehák *et al.*, 1994; Chemnitius, 1994) oder über die Abnahme der Sauerstoffkonzentration (Hu und Liu, 1997).



HPLC-Analysen von Proben, die während einer *E.coli*-Hochzelldichte-Fermentation genommen wurden, ergaben, daß die Nukleobase extrazellulär in einem Konzentrationsbereich von 5 – 270 µM vorlag (Rinas *et al.*, 1995). Da unter Verwendung der Xanthin-Oxidase als enzymatisches Detektionssystem eine Nachweisgrenze von 0,2 µM beobachtet wurde (Zhao *et al.*, 1996), eignen sich amperometrische Biosensoren grundsätzlich zur Xanthin-Bestimmung in diesen Realproben.

1.5.2 Chromatographische Methoden

Chromatographische Trennverfahren wie die High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) werden im allgemeinen sowohl zur Analyse des Nukleotidspektrums von komplexen Proben wie Zellextrakten als auch zur Bestimmung von Einzelparametern eingesetzt. Zur Analyse von Nukleotidpools, die ATP und Xanthin enthalten, stehen im wesentlichen drei unterschiedliche Methoden zur Verfügung. Über eine Ionenaustauscher-Chromatographie lassen sich sehr gut die geladenen Mono-, Di- und Triphosphate der Nukleotide trennen. Weniger gut geeignet ist diese Methode hingegen für die Bestimmung von Nukleosiden und Nukleobasen; außerdem ist die benötigte Analysendauer mit einer Stunde pro Lauf relativ lang. Mit Reversed-Phase-Säulen (RP) und Phosphat-gepufferten Methanol- oder Acetonitril-

gradienten erreicht man kürzere Laufzeiten, allerdings kommt es hier zu Schwierigkeiten bei der Trennung hoch geladener Nukleotide und aktivierter Zucker (Litt *et al.*, 1989). Das gesamte Nukleotidspektrum läßt sich über eine dritte Variante separieren, bei der eine Verlängerung der Retentionszeiten geladener Nukleotide durch den Zusatz von amphiphilen Substanzen wie Tetrabutylammoniumhydrogensulfat oder -phosphat zur mobilen Phase erreicht wird (Hoffmann und Liao, 1977; Juengling und Kammermeier, 1980). Diese als Ionenpaar-Reversed-Phase HPLC bezeichnete Methode hat die beiden zuvor beschriebenen Verfahren auf dem Gebiet der Nukleotidanalytik bis zum heutigen Tage zum großen Teil verdrängt (Di Pierro *et al.*, 1995; Barnabé und Butler, 1998). Da Nukleotide in einem Wellenlängenbereich zwischen 250 und 280 nm stark absorbieren, detektiert man in der Regel bei 254 oder 280 nm, aber auch andere Nachweisprinzipien wurden bereits zur Nukleotiddetektion eingesetzt. Adenin und strukturverwandte Substanzen wie das ATP lassen sich mit Chloracetaldehyd zu 1,N⁶-Ethenoderivaten modifizieren, die über Fluoreszenz detektiert werden können (Kawamoto *et al.*, 1998). Ebenfalls für ATP ist ein duales Nachweisverfahren mittels Leitfähigkeitsmessung und Bestimmung der UV-Absorption beschrieben worden (Bhattacharya *et al.*, 1995; Poquet *et al.*, 1996). Im Anschluß an eine HPLC-Trennung wurden Xanthin und weitere Purinnukleotid-Abbauprodukte an einer Glassy-Carbonelektrode auch amperometrisch detektiert (Liu *et al.*, 1995).

1.5.3 Kapillarelektrophorese (CE)

Neben der Chromatographie ist die Elektrophorese die Technik, die am häufigsten zur Trennung biologischer und chemischer Proben eingesetzt wird, wobei die Analyte aufgrund ihrer unterschiedlichen elektrophoretischen Mobilitäten separiert werden. Die elektrophoretische Mobilität μ ist eine für jedes Molekül individuelle physikalische Konstante, die durch die Ladung q und die ausgeübte Reibung, die wiederum von der molekularen Masse abhängt, bestimmt wird.

$$\mu = \frac{q}{6\pi\eta r} \quad (4)$$

mit r = Stoke'scher Radius; η = dynamische Viskosität

In der Kapillarelektrophorese wird die Trennung in dünnen Siliziumkapillaren (*fused silica*) durchgeführt, an die sich eine *on-line* UV- oder Fluoreszenzdetektion anschließt. Diese Technik wurde zu einer leistungsstarken analytischen Methode entwickelt, die sich zunächst besonders bei der Trennung von kleinen organischen und anorganischen Ionen bewährt hat, mit der aber auch große Biopolymere wie DNA und RNA analysiert werden können. Gegenüber der klassischen Flachbett-Gelelektrophorese weist die CE einige Vorteile auf, so wird z. B. die Joulesche Wärme aufgrund des großen Oberflächen/Volumen-Verhältnisses in den Kapillaren effizient abgeführt und das Auftreten von Konvektionsströmen praktisch vollständig unterbunden. Im Vergleich zur Gelelektrophorese, bei der diese Abführung Schwierigkeiten bereitet, können bei der CE wesentlich höhere Spannungen angelegt und damit auch kürzere Analysenzeiten erreicht werden. Auch vom methodischen Gesichtspunkt betrachtet zeigt sich die CE überlegen, da zeitaufwendige Arbeitsschritte wie das Gelgießen und die –beladung nicht länger notwendig sind und sich vor allem die Detektion, die sich bei der klassischen Variante lediglich über eine Anfärbung des Gels vornehmen läßt, deutlich vereinfacht hat.

Historisch betrachtet wurden die Pionierarbeiten zur Entwicklung der Kapillarelektrophorese bereits in den 50er und 60er Jahren durchgeführt, als Hjertén elektrophoretische Trennungen in offenen Glasröhren demonstrierte (Hjertén, 1967). Die eigentliche Entwicklung der CE setzte dann erst gut zehn Jahre später mit den Arbeiten von Mikkers *et al.* (1979) und Jorgenson und Lukacs (1981) ein. Der Aufschwung der Methode war sowohl auf die Verfügbarkeit qualitativ hochwertiger Kapillaren mit sehr kleinen Innendurchmessern (20 – 100 µm) als auch auf neue Detektoren mit verbesserter Sensitivität zurückzuführen.

ATP wird in der Regel durch Kapillarzonenlektrophorese (CZE) getrennt und im UV-Bereich oder durch indirekte Laser-induzierte Fluoreszenz (LIF) detektiert. Mit Hilfe dieser Methode ist es möglich auch nicht fluoreszierende Analyte wie ATP über Fluoreszenz-Detektion nachzuweisen, indem man dem Puffer einen fluoreszierenden Elektrolyten zusetzt, der eine ähnliche Mobilität besitzt wie die zu trennende Probe. In der Probenzone muß aufgrund der erforderlichen Elektroneutralität die Konzentration des Fluorophors geringer sein, was sich durch einen negativen Peak bemerkbar macht (Kap. 2.2.9.2). Ähnlich wie bei der HPLC kann

ATP als Adeninnukleotid aber auch mit Chloracetaldehyd derivatisiert und über direkte LIF nachgewiesen werden. Für Xanthin sind keine Modifizierungsreaktionen mit einem Fluorophorlabel bekannt, da es über UV-Absorption oder elektrochemisch nachgewiesen wird, wobei die Trennung über CZE oder micellare elektrokinetische Chromatographie (MEKC) erfolgen kann. Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über die zur ATP- und Xanthin-Bestimmung in der Literatur beschriebenen CE-Trenntechniken und Detektionsmethoden.

Analyt	CE-Technik	Detektion	Probe	Quelle
ATP	CZE	indirekte LIF	wäßrige Lösung	Gross und Yeung, 1989
ATP	CZE	Fluoreszenz	Zellextrakt	Tseng <i>et al.</i> , 1994
Xanthin	MEKC	UV _{214 nm}	Pharmazeutika	Korman <i>et al.</i> , 1994
Xanthin	CZE	UV _{280 nm}	Serum, Urin	Shihabi et al, 1995
Xanthin	CZE	elektrochemisch	Blutplasma	Lin <i>et al.</i> , 1997

Tab. 1: CE-Techniken zur Bestimmung von ATP und Xanthin

1.6 Mikrosysteme

Miniaturisierte Systeme zur (bio)chemischen Analyse gewinnen in den Gebieten der Biochemie, analytischen Chemie und Mikrotechnologie immer größeres Interesse. Durch moderne Mikrotechniken wurden die technologischen Voraussetzungen für die Miniaturisierung einzelner Komponenten und ihrer Integration zu einem Mikrosystem geschaffen. Die Mehrzahl der Mikrotechniken hat ihren Ursprung in der Mikroelektronik, die jedoch in Hinblick auf miniaturisierte analytische Systeme angepaßt und weiterentwickelt wurden. In diesem Zusammenhang hat die Bedeutung der Mikrofluidik in den letzten Jahren stark zugenommen. In mikrofluiden Systemen können Flüssigkeiten und Gase transportiert werden, wobei in der Regel eine Förderleistung von wenigen Mikrolitern pro Minute erreicht wird. Mit diesen Systemen können vielfältige Anwendungen, die vom reinen Transport bis hin zum Vermischen, Filtrieren, Separieren und Analysieren einer Probe reichen, durchgeführt werden.

Mit der Miniaturisierung lassen sich einige Vorteile gegenüber den konventionellen Makrosystemen erzielen. So wird durch die Reduzierung der Systemgröße die

Analysendauer verkürzt, die benötigte Fluidmenge deutlich herabgesetzt, was zu einem geringen Probenbedarf sowie einem niedrigen Reagenzienverbrauch und letztendlich - bei der Verwendung organischer Lösungsmittel - zu einer Verringerung der Abfallmenge führt. In großen Stückzahlen lassen sich die Mikrosysteme durch die Herstellung im Batch-Prozeß relativ preiswert fertigen (Büttgenbach, 1991).

Im Bereich der Biochemie und analytischen Chemie wurden mit mikrofluiden Systemen bereits Trennungen über Kapillarelektrophorese (Harrison *et al.*, 1993), DNA-Sequenzierungen (Goffeau, 1997), Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (Kopp *et al.*, 1998), Synthese und Charakterisierung von Peptid- und Oligonukleotid-Bibliotheken (Fodor *et al.*, 1993) und die Isolierung und Untersuchung einzelner biologischer Zellen beispielsweise zum Auffinden pharmazeutischer Wirkstoffe, durchgeführt (Fromherz *et al.*, 1991; Cheng *et al.*, 1998; Müller *et al.*, 1999).

1.6.1 Miniaturisierte totale Analysesysteme (μ TAS)

In der chemischen Analytik wird die Bestimmung einer Meßgröße in der Regel in die Einzelschritte Probenahme, Probentransport, Probenvorbereitung, Trennung/chemische Reaktion, Detektion und Datenverarbeitung unterteilt. Das Ziel eines totalen Analysesystems (TAS) ist es, daß alle zuvor beschriebenen Teilschritte in diesem Gerät integriert sind. Seit Beginn der 90er Jahre wurden zwei Konzepte zur Verwirklichung eines μ TAS verfolgt (Harrison und van den Berg, 1998), wobei sich das erste im wesentlichen mit grundlegenden Entwicklungsarbeiten zu Mikropumpen und –ventilen beschäftigte, die dann zu einem analytischen Mikrosystem kombiniert wurden. Der alternative zweite Ansatz basierte auf einem einfachen Netzwerk sich kreuzender mikro-Fließkanäle, die in Silizium oder Glas geätzt und in denen Flüssigkeiten über elektroosmotische Effekte transportiert wurden. Aufgrund der negativen Oberflächenladung der Glaskapillaren kommt es zu einer Wechselwirkung mit den Pufferkationen, die dazu führt, daß bei Anlegen eines äußeren elektrischen Feldes, die gesamte Flüssigkeit in eine Richtung bewegt wird (Kap. 2.2.8.2). Da die Elektroosmose auch eine Richtungskontrolle des Flusses an den Schnittpunkten im Kapillarsystem ermöglicht, ist die Integration mechanischer Komponenten wie Pumpen oder Ventile nicht notwendig. Mit Hilfe des Herstellungsverfahrens lassen sich Elemente wie Misch- und Reaktionskammern, Fritten und Fließwiderstände in

das Kanalnetzwerk integrieren, ohne daß sich der Kosten- und Produktionsaufwand im Vergleich zur Erzeugung einfacher gerader Kapillaren wesentlich verändert. Neben der Bezeichnung μ TAS hat sich in den letzten Jahren der Begriff *Lab-on-a-Chip* für Systeme etabliert, die eine Durchführung aller für eine Analyse notwendigen Teilschritte auf einem monolithischen Chip erlauben.

1.6.2 Mikro-Kapillarelektrophorese (μ CE)

Als besonders interessant hat sich die Verwendung von Mikrosystemen, die aus einem Kapillarnetzwerk bestehen, zur Trennung biologischer und chemischer Substanzen erwiesen, einem wichtigen Verfahren innerhalb der Laboranalytik, das Aussagen über die Identität und Quantität einer gesuchten Komponente liefert. Zu den miniaturisierten Methoden zählen die Kapillarelektrophorese (Harrison *et al.*, 1993), Free-Flow Elektrophorese (Raymond *et al.*, 1994), Gaschromatographie (Terry *et al.*, 1979), Flüssigkeits-Chromatographie (Ocvirk *et al.*, 1995), Kapillar-Elektrochromatographie (Jacobson *et al.*, 1994) und die micellare elektrokinetische Kapillarchromatographie (von Heeren *et al.*, 1996).

Ein Großteil der Untersuchungen beschäftigte sich jedoch mit der Miniaturisierung der CE, nicht zuletzt da der Durchmesser der in kommerziellen CE-Instrumenten verwendeten Kapillaren im allgemeinen zwischen 20 und 100 μ m liegt und damit in Größen, die mit konventionellen Mikrotechniken ohne Schwierigkeiten aufgelöst werden können. Die Pionierarbeiten hierzu wurden vor allem von den Gruppen um D.J. Harrison und A. Manz Anfang der 90er Jahre geleistet (Harrison *et al.*, 1992; Manz *et al.*, 1992). Die folgende Tabelle 2 gibt einen Überblick über Veröffentlichungen im Bereich der μ CE.

Analyte	Chip	Detektion	Literaturquelle
Aminosäuren	Silizium	Fluoreszenz	Raymond <i>et al.</i> , 1994
Aminosäuren	Glas	Fluoreszenz	Harrison <i>et al.</i> , 1993
Serumproteine	Glas	Fluoreszenz	Colyer <i>et al.</i> , 1997
Antikörper, Theophyllin	Glas	Fluoreszenz	Chiem und Harrison, 1997
DNA	Glas	Fluoreszenz	Khandurina <i>et al.</i> , 1999
biogene Amine	Glas	Fluoreszenz	Rodríguez <i>et al.</i> , 1999
Neurotransmitter	Glas	elektrochemisch	Woolley <i>et al.</i> , 1998
Affinitätskomplexe	Glas	Chemilumineszenz	Mangru und Harrison, 1998

Analyte	Chip	Detektion	Literaturquelle
Protein-Verdau	Glas	Elektrospray-MS	Li <i>et al.</i> , 1999
Peptide	Glas	Elektrospray-MS	Zhang <i>et al.</i> , 1999
DNA, Aminosäuren, Proteine	Polydimethyl- siloxan (PDMS)	Fluoreszenz	Duffy <i>et al.</i> , 1998
Aminophenol	Polyethylen- terephthalat	elektrochemisch	Rossier <i>et al.</i> , 1999

Tab. 2: Publikationen im Bereich der μ CE

1.6.2.1 Chip-Materialien

Nachdem die ersten μ CE-Systeme in Silizium als Trägermaterial gefertigt wurden, hat sich die Verwendung von photostrukturierbarem Glas aufgrund der besseren optischen, elektrischen und chemischen Eigenschaften als geeigneter erwiesen. So können zum Transport von Flüssigkeiten und zur Trennung der Probe höhere Spannungen angelegt werden und eine optische Detektion wird durch die Transparenz des Materials erleichtert. Durch die Oberflächenbeschaffenheit des Glases wird darüber hinaus gewährleistet, daß sich Reaktionen zur Beschichtung der Kapillaren problemlos von konventionellen Systemen auf einen Chip übertragen lassen. Trotz der beschriebenen Vorteile ist die Strukturierung des Glases jedoch nur mit instrumentell aufwendigen photolithographischen Methoden zu erzielen, so daß sich in den letzten zwei bis drei Jahren die Untersuchungen zu neuen Materialien und alternativen Herstellungsverfahren verstärkt haben. Von besonderem Interesse sind hierbei preiswerte Substrate wie organische Polymere, in die über Heißprägen (Becker *et al.*, 1998) oder Laser-Ablation (Roberts *et al.*, 1997) ein mikrofluides Kapillarnetzwerk abgebildet werden kann. Eine weitere Methode nutzt viskose Polymere wie Polydimethylsiloxan (PDMS), in die das Netzwerk zunächst mit einem in Silizium gefertigten Positivmaster geprägt wird, die Aushärtung der Substrate erfolgt anschließend thermisch (Effenhauser *et al.*, 1997; McDonald *et al.*, 2000).

1.6.2.2 Detektion

Zu der am häufigsten eingesetzten Detektionsmethode im Bereich der mikrofluiden Systeme zählt die Laser-induzierte Fluoreszenz (LIF). In den letzten Jahren sind aber auch andere Nachweisverfahren wie z. B. Absorption-Detektion

über optische Fasern bei 488 nm (Liang *et al.*, 1996), Elektrochemie (Wolley *et al.*, 1998) und Elektrospray-Massenspektrometrie (Pinto *et al.*, 2000) eingesetzt worden. Einige Prinzipien wie die UV-Absorption lassen sich zum heutigen Zeitpunkt noch nicht auf Mikrochipbasis anwenden, da die durch die geringen Kanaltiefen bestimmten Weglängen (10 - 30 μm) nicht ausreichend lang für dieses Nachweisverfahren sind. Allerdings lassen sich die meisten der oben angeführten Detektionseinheiten nicht auf einen Chip integrieren, so daß der Begriff *Lab-on-a-Chip* in diesen Fällen nicht wirklich zutreffend ist. Hohes Integrationspotential besitzt die Elektrochemie, da es mit Hilfe von Mikrotechniken gelingt, Mikroelektrodensysteme sowie weitere benötigte elektronische Bauteile zu fertigen. Da jedoch die elektrochemische Detektion nur durchgeführt werden kann, wenn das im Millivolt-Bereich liegende Potential der Arbeitselektrode ausreichend von der zur Trennung nötigen Hochspannung abgeschirmt wird, hat sich diese Detektionsmethode noch nicht ausreichend etabliert.

Kommerziell ist das Konzept der Mikrochip-CE bisher lediglich im Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Waldbronn) umgesetzt worden. Mit diesem Gerät ist die parallele Bestimmung von 12 DNA/RNA-Proben in weniger als 30 min möglich, wobei jeweils nur 1 μl Probe zur Verfügung stehen muß (Müller *et al.*, 2000). Bedingt gerade durch den geringen Probenbedarf, die kurze Analysendauer und die Möglichkeit zur Erweiterung auf ein bis zu 96-Kanalsystem (Simpson *et al.*, 1998) gibt es zahlreiche Bemühungen, diese Systeme für analytische Fragestellungen zu etablieren, die eine Vielzahl elektrophoretischer Trennungen erfordern. Von besonderem Interesse in diesem Zusammenhang sind High-Throughput-Screening-Verfahren zur Wirkstofftestung und die Aufklärung des humanen Genoms.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Adenosin-5'-triphosphat	Sigma, Deisenhofen
3-Aminopropyltriethoxysilan (APTS)	Aldrich, Steinheim
Borsäure	Riedel-de Haën, Seelze
Citronensäure-1-hydrat	Riedel-de Haën, Seelze
Di-Kaliumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
DEAE Dextran	Sigma, Deisenhofen
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck, Darmstadt
Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)-carbodiimid (EDC)	Sigma, Deisenhofen
Fluorescein (di-Natrium-Salz)	Sigma, Deisenhofen
β -D-Glucose	Merck, Darmstadt
Glutardialdehyd (25%)	Merck, Darmstadt
3-Glycidoxypropylmethoxysilan (GOPS)	ABCR, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Riedel-de Haën, Seelze
Kaliumhexacyanoferrat (III)	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Lactitol	Sigma, Deisenhofen
Luminol	Sigma, Deisenhofen
Natriumacetat	Riedel-de Haën, Seelze
Natriumhydrogencarbonat	Riedel-de Haën, Seelze
Natriumhydroxid	Riedel-de Haën, Seelze
Perhydrol 30%	Merck, Darmstadt
Poly-L-lysinhydrochlorid	Aldrich, Steinheim
Rinderserumalbumin (BSA), Fraktion V	Sigma, Deisenhofen
Xanthin (Na-Salz)	Sigma, Deisenhofen

Außer den hier aufgeführten Chemikalien wurden Produkte der Firmen Merck, Darmstadt und Aldrich, Steinheim in p.A. Qualität verwendet.

2.1.2 Enzyme

Glucose-Oxidase a. *Aspergillus niger*, EC 1.1.3.4 (200 U/mg), Boehringer Mannheim

Hexokinase aus Bäckerhefe, Typ III, EC 2.7.1.1 (20 U/mg), Sigma, Deisenhofen

Xanthin-Oxidase aus Kuhmilch, EC 1.1.3.22 (0,1 U/mg), Boehringer Mannheim

Peroxidase aus Meerrettich Typ VI-A, EC 1.11.1.7 (1000 U/mg), Sigma, Deisenhofen

2.1.3 Verwendete Puffer

Clark & Lubs-Puffer (C&L):
(50 mM) Zugabe eines individuellen Volumens von 0,1 M NaOH zu 500 ml einer 0,1 M Borsäure/KCl-Lösung bis zum Erreichen des erforderlichen pH-Wertes und Auffüllen auf 1000 ml Endvolumen mit H₂O dest.

Kaliumphosphat-Puffer (KPP):
(0,1 M) Mischen von 0,1 M K₂HPO₄ und 0,1 M KH₂PO₄ bis zur Einstellung des gewünschten pH-Wertes

CE-Puffer (10 mM): Mischen von 10 mM Borsäure und 10 mM NaHCO₃ bis zur Einstellung von pH 9,2

Borat-Puffer (50 mM): 0,05 M Borsäure mit 1 M NaOH auf pH 9 eingestellt

Acetat-Puffer (50 mM): 0,05 M Natriumacetat mit 1 M Citronensäure auf pH 5,5 eingestellt

2.1.4 Glas-Beads

Controlled pore glass (CPG) Fluka, Deisenhofen

Nucleosil 1000-5 Silica Beads Macherey-Nagel, Düren

2.1.5 Geräte

2.1.5.1 Fließinjektionssystem

Peristaltische Pumpen: Meredos, Nörten Hardenberg

Injektionsventil V 100: Perstorp Analytik GmbH, Rodgau

Potentiostat VA 641:	Metrohm, Herisau, Schweiz
DA/AD-Wandlerkarte	Metabyte Corp., Taunton, USA
Pumpenschläuche:	Ismatec, Zürich, Schweiz
Teflon-Schläuche:	0,5 mm ID, Omnifit, Cambridge, Großbritannien
Durchflußzelle:	GBF, Braunschweig
Steuersoftware FiaFox 2.11:	GBF, Braunschweig

2.1.5.2 Herstellung von Dickschichtsensoren

Aluminiumoxid Substrate:	50,8 x 50,8 mm, Hoechst CeramTech, Marktredwitz
Brennofen 7354-M:	BTU Eng. Corp., Großbritannien
Druckmaschine Microtronic:	EKRA, Kirchheim
Monolen Nylonsiebe:	Schlee, Fürth
Trockenschrank:	Heraeus, Karlsruhe

Druckpasten

Silber/Palladium 7474	DuPont, Bad Homburg
Platinpaste Conduro 3804	Ferro, Sindelfingen
Kohlenstoffpaste C-458	Ercon, Waltham, USA
Glaspasivierung 5032	DuPont, Bad Homburg
Isolierung R-488(HV)	Ercon, Waltham, USA

2.1.5.3 Kapillarelektrophorese:

System:	P/ACE System 5010, Beckman Instruments, Fullerton, USA
Detektoren:	UV/VIS Argon-Ionenlaser, Anregungswellenlänge 488 nm
<i>fused silica</i> Kapillaren :	50 µm ID, Polymicro Technologies, Phoenix, USA

2.1.5.4 Mikrofluide Systeme:

Glas:	4 x 4 inch, 540 µm, Corning 0211, Corning Glass, Parkridge, USA
Chip-Strukturierung:	Alberta Microelectronic Corporation, Edmonton, Kanada
Argon-Ionenlaser:	Uniphase, San Jose, USA

Optische Komponenten:	Melles, Griot, Irvine, USA
Mikroskop-Objektiv:	25x, 0,35 NA; Leitz, Wetzlar
Photomultiplier:	R 1477/R 3896, Hamamatsu, Bridgewater, USA
Hochspannungsquellen:	University of Alberta, Edmonton, Kanada
Relaissystem:	University of Alberta, Edmonton, Kanada
LabVIEW:	National Instruments, Austin, USA

2.2 Methoden

2.2.1 Dickschichttechnologie

Neben der Herstellung von bedruckten Textilien, Plakaten und Produktbänderolen findet der Siebdruck auch in der Elektronikindustrie Anwendung. Durch die Möglichkeit elektrisch leitende bzw. isolierende Flächen durch das Drucken von hochviskosen, gegebenenfalls metallhaltigen Pasten zu erzeugen, wird der Siebdruck zur Serienfertigung von Hybridschaltungen bis zu mittleren Stückzahlen eingesetzt (Reichel, 1988).

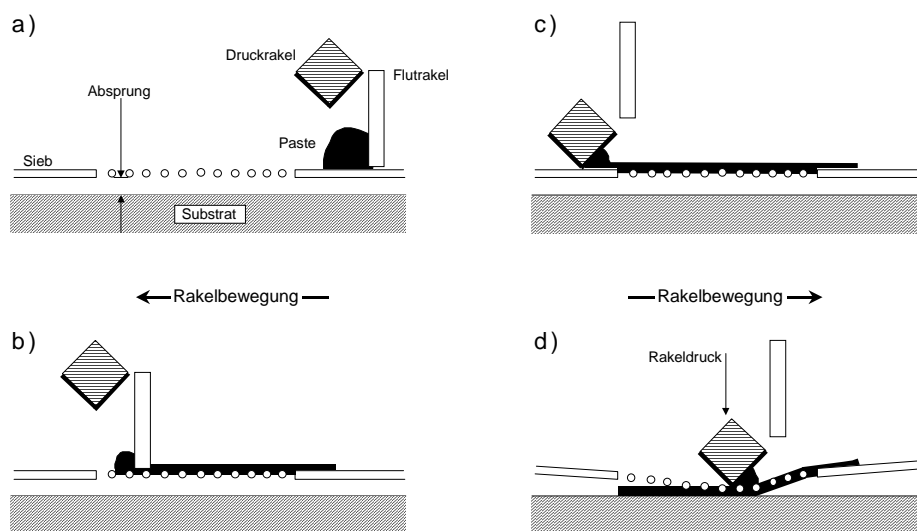


Abb. 2: Schematische Darstellung eines Siebdruckprozesses; a: Startposition mit abgesenktem Flutrakel; b: Verteilen der Paste über dem Druckmotiv; c: Absenken des Druckrakels; d: Durchdrucken der Paste auf das Substrat (Stiene, 1997)

Elektrochemische Sensoren werden mit Hilfe dieser Technologie produziert, indem Pasten mit definierten elektrischen Eigenschaften durch ein Sieb auf ein Substrat, in der Regel starre Aluminiumoxidkeramiken oder flexible Kunststoffträger, gedruckt werden. Das Sieb wird im allgemeinen in Schablonentechnik strukturiert. Dazu wird es zunächst mit einer lichtempfindlichen Emulsion beschichtet, und die Bereiche, die nicht von einer Schablone überdeckt werden, härten durch UV-Bestrahlung aus. An den unbelichteten Flächen läßt sich die Emulsion auswaschen, so daß die Siebmaschen an diesen Stellen geöffnet bleiben, durch die im späteren Druckprozeß die Paste mit Hilfe eines Rakels auf den Träger gedruckt werden kann (Abb. 2).

Kommerziell erhältliche Dickschichtpasten bestehen hauptsächlich aus einem organischen Trägermaterial (Bindemittel) und Mikropartikeln aus Metallen, Metalloxiden, Gläsern, Graphit- oder Kohlenstoffpulver, die zu einer pastösen Matrix vereinigt werden und in Abhängigkeit vom Verwendungszweck in ihrer Zusammensetzung variiert werden können.

Das Druckergebnis und damit verbunden die Qualität der Sensoren hängen von folgenden Parametern ab:

- Viskosität der Paste; speziell: Änderung der Viskosität während des Druckprozesses
- Material des Siebes sowie Maschenweite, Siebspannung und -absprung
- Parallelität zwischen Substrat und Rakel
- Rakeldruck, -geschwindigkeit, -winkel und Härte des Rakelmaterials

Nach dem Drucken werden die Strukturen zunächst im Trockenschrank bei 120° bis 150°C ausgehärtet. Die meisten Hochtemperaturpasten werden anschließend in einem Durchlaufofen gebrannt, um die Glas- und Metallpartikel zu versintern. Ein charakteristisches Profil mit den einzelnen Brennzonen ist in Abbildung 3 gezeigt.

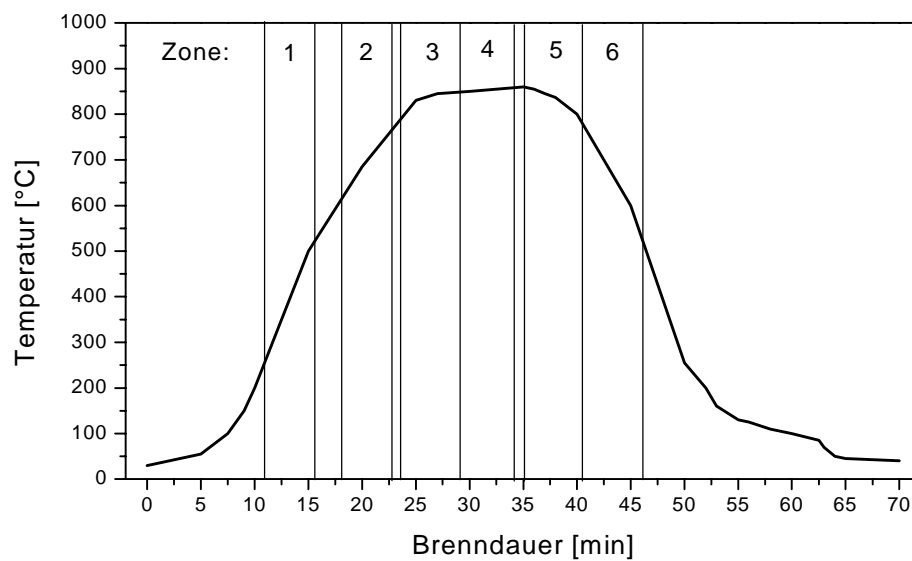


Abb. 3: Brennprofil des BTU 6-Zonen Durchlaufofens

Die folgende Tabelle 3 beschreibt die Prozesse, die in den einzelnen Zonen des verwendeten Temperaturprogramms in der gedruckten Paste ablaufen:

Zone	Temperatur [°C]	Prozeß in der Paste
1	425	Verbrennung organischer Bestandteile
2	695	Glaserweichung
3	850	Glaserweichung und Beginn der Versinterung
4	850	Versintern der Metallpartikel in der Glasschmelze
5	850	Versintern der Metallpartikel in der Glasschmelze
6	750	Erhärtung des Glases

Tab. 3: Ablaufende Pastenprozesse während des Brennvorganges (White, 1994)

2.2.2 Herstellung planarer Elektrodensysteme

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Sensoren mit den in Abbildung 4 gezeigten Layouts verwendet.

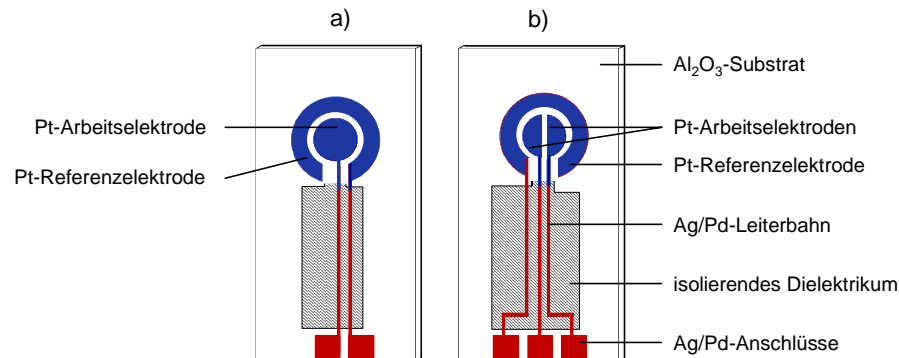


Abb. 4: Layout der gedruckten Dickschichtelektroden; Keramik 12,7 x 25,4 mm a: Sensor mit einer Arbeitselektrode ($5,1 \text{ mm}^2$); b: Sensor mit zwei Arbeitselektroden (je $5,3 \text{ mm}^2$)

In den Tabellen 4a und 4b sind die Druckparameter für die produzierten Sensoren mit zwei Arbeitselektroden zusammengefaßt; für die Untersuchungen mit Einfachsensoren wurde auf bereits an der GBF produzierte Elektroden zurückgegriffen. Alle Parameter, die mit einem * gekennzeichnet sind, tragen willkürliche Einheiten, die an der Druckmaschine vorgewählt wurden.

Platin-Sensoren	Arbeits-elektroden	Referenz-elektrode	Leiterbahnen	Isolierung
Paste	Ferro 3804	Ferro 3804	DuPont 7474	DuPont 5032
Materialtyp	Platin	Platin	Ag/Pd	Epoxidharz
Absprung [mm]	0,84	0,82	1,1	0,73
Rakelgeschw.*	155	155	250	250
Rakelweg*	750	850	850	750
Brenntemp. [°C]	850	850	850	850
Brenndauer [min]	60	60	60	60

Tab. 4a: Druckparameter für Dickschichtsensoren mit zwei Platin-Arbeits Elektroden

Carbon-Sensoren	Arbeits-elektroden	Referenz-elektrode	Leiterbahnen	Isolierung
Paste	Ercon 458	Ferro 3804	DuPont 7474	Ercon R-488
Materialtyp	Kohlenstoff	Platin	Ag/Pd	Epoxidharz
Absprung [mm]	0,7	0,8	1,1	0,7
Rakelgeschw.*	200	125	125	200
Rakelweg*	875	875	750	875
Brenntemp. [°C]	170	850	850	170
Brenndauer [min]	60	60	60	60

Tab. 4b: Druckparameter für Dickschichtsensoren mit zwei Carbon-Arbeits Elektroden

2.2.3 Enzymimmobilisierung

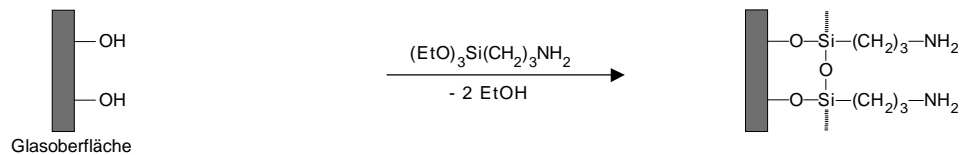
Enzyme lassen sich über unterschiedliche Methoden, zu denen kovalente, adsorptive und Polymereinschluß-Verfahren zählen, auf feste Trägermaterialien immobilisieren. Durch die Wiederverwertbarkeit der Enzyme zeichnen sich Systeme mit einer immobilisierten biologisch aktiven Komponente im Vergleich zu Instrumenten, die für jede einzelne Analyse die Bereitstellung einer frischen Enzymlösung erfordern, durch eine kostengünstigere Betriebsweise aus. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten Verfahren zur Enzymimmobilisierung auf verschiedenen Substraten werden im folgenden beschrieben.

2.2.3.1 Immobilisierung über Glutardialdehyd

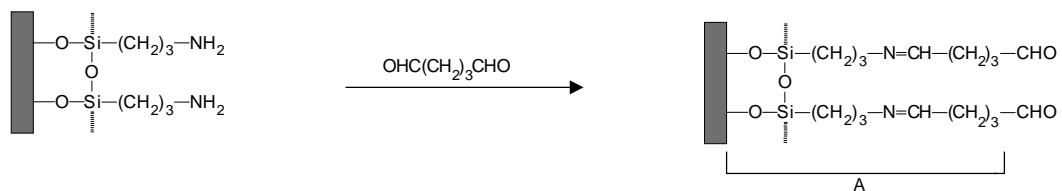
Die Kopplung von Enzymen über Glutardialdehyd an feste Träger zählt zu den in der Literatur am häufigsten beschriebenen Verfahren. Mit dieser Methode wurden die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Enzyme sowohl auf Platin-Dickschichtelektroden als auch auf poröse Glas-Beads immobilisiert. Die Oberflächen beider Trägermaterialien wurden hierfür zunächst modifiziert, indem sie mit einem Silanisierungsreagenz (APTS) vorbehandelt wurden. Durch die Reaktion des Silans mit Hydroxylgruppen wurden Aminogruppen auf die Oberfläche aufgebracht, die im nächsten Schritt mit Glutardialdehyd unter Ausbildung einer Schiff'schen Base reagierten. An das aktivierte Trägermaterial wurden anschließend die Enzyme über ihre Aminofunktion kovalent gekoppelt. Der in Abbildung 5 dargestellte Reaktions-

mechanismus gilt unabhängig vom Trägermaterial; aufgrund der unterschiedlichen Oberflächeneigenschaften waren die Reaktionsbedingungen zur Kopplung auf Elektroden bzw. Glas-Beads jedoch verschieden.

Alkylaminkupplung:



Glutardialdehyd-Aktivierung:



Enzymkupplung:

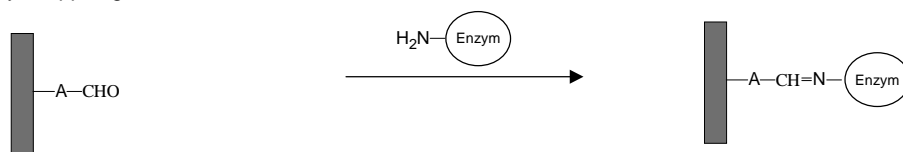


Abb. 5: Immobilisierung von Enzymen über Glutardialdehyd auf APTS-silanisierte Oberflächen

Vorschrift zur Enzymimmobilisierung auf Platindickschichtelektroden:

Um eine bessere Haftung der Enzymschicht zu erzielen, wurden die Elektroden für 15 min in eine 10%ige wäßrige Aminopropyltriethoxysilan (APTS)-Lösung (v/v) getaucht, anschließend gründlich mit Wasser abgespült und bei Raumtemperatur getrocknet. In einem Eppendorf-Reaktionsgefäß wurde folgende Lösung vorsichtig vermischt:

7 μl Enzymlösung (Konzentration vom jeweiligen Enzym abhängig)

3 μl BSA-Lösung (100 mg/ml)

1,5 μl 2,5%ige Glutardialdehyd-Lösung (v/v)

1,5 µl der Immobilisierungslösung wurden anschließend luftblasenfrei auf die Fläche der Arbeitselektrode pipettiert. Nach Trocknung der Enzymschicht bei RT wurden die Elektroden bis zu ihrer Verwendung bei 4°C gelagert.

Vorschrift zur Enzymimmobilisierung auf Glas-Beads

Die porösen Glas-Beads, Controlled Pore Glass (CPG) und Nucleosil-Beads, wurden zunächst in 10% HNO₃ für 1 h bei 90°C gereinigt. Anschließend wurden die Träger mit Wasser säurefrei gewaschen und bei 200°C über Nacht getrocknet. Für die Silanisierung wurden die Glaspartikel bis zum Zehnfachen ihres Schüttvolumens mit einer 10%igen APTS/Aceton-Lösung (v/v) überschichtet und über Nacht mäßig bei RT geschwenkt. Durch mehrmaliges Waschen mit Aceton wurde überschüssiges Silanisierungsreagenz entfernt und die Beads nochmals bei 45°C getrocknet. Die Aktivierung erfolgte mit einer 2,5%igen Glutardialdehyd-Lösung (v/v) in 0,1 M KPP-Puffer pH 6,0, in der die Glasträger im Mischungsverhältnis von etwa 1:5 suspendiert wurden. Um die Luft, die in den Poren des Trägermaterials verblieben war, zu entfernen und somit eine vollständige Benetzung der Oberfläche zu gewährleisten, wurde für 15 min ein Wasserstrahlvakuum angelegt. Die Suspension wurde 90 min bei RT geschüttelt, das überschüssige Glutardialdehyd anschließend durch mehrmaliges Waschen mit Puffer entfernt. Die Immobilisierung wurde durchgeführt, indem die in einem Mischungsverhältnis von 1:5 (v/v) hergestellte Suspension aus aktivierten Beads und 2 mg/ml Enzymlösung 2 h bei RT oder über Nacht bei 4°C geschüttelt wurde. Bis zur Verwendung wurde das Immobilisat in Puffer bei 4°C gelagert.

2.2.3.2 UV-Polymerisation

Neben kovalenten und rein adsorptiven Verfahren ist es auch möglich, Enzyme unter Erhalt ihrer Aktivität in Polymeren einzuschließen. Hierzu wurden Enzym- und BSA-Lösungen mit verschiedenen gelösten Supplementen wie Lacitol, DEAE-Dextran oder Poly-L-lysin gemischt. 20 µl dieser Lösungen wurden zu 45 mg einer wasserlöslichen, UV-vernetzbaaren Siebdruck-Transparentmasse gegeben und gleichmäßig verrührt. Diese Paste wurde mit Hilfe einer manuellen Siebdruckmaschine (HT 10, Fleischle, Brackenheim) auf die Arbeitselektrode aufgebracht. Bei Verwendung der Zweifachsensoren wurde jeweils nur eine Arbeitselektrode beschichtet. Zur Aushärtung wurden die bedruckten Substrate etwa für 5 s im

Abstand von 15 cm der Strahlung einer UV-Quecksilber-Dampf-Lampe (100 W, Osram, Hannover) ausgesetzt (Abb. 6). Zur besseren Reproduktion der Vernetzungsbedingungen wurde auch ein Durchlauf-UV-Trocknungsgerät (Aktiprint mini, Technigraf GmbH, Grävenwiesbach) verwendet, mit dem der Abstand vom Substrat zur Lichtquelle sowie die Bestrahlungsdauer exakt reguliert wurde.

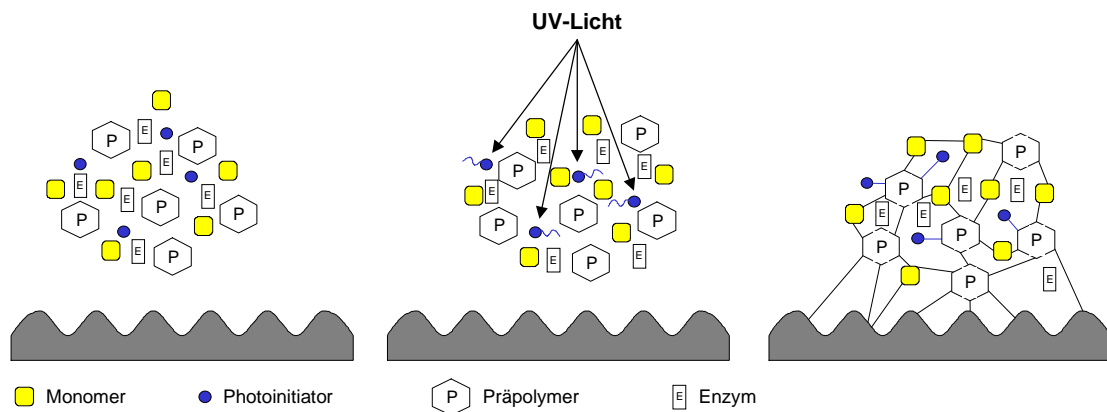


Abb. 6: UV-Polymerisation einer Enzympaste auf dem Dickschichtsensor (Rohm, 1996)

Die wesentlichen Bestandteile einer UV-vernetzbaaren Siebdruckfarbe sind in der Regel Präpolymere/Oligomere (Polyester-, Epoxy- oder Urethanacrylate), Monomere (Acrylatsäureester) und Photoinitiatoren (Radikalkettenstarter). Das Rückgrat der Farbe wird dabei von den Präpolymeren gebildet, bei denen es sich um Kunstharze mit eingebauten C = C-Doppelbindungen handelt. Über die Anzahl der funktionellen Gruppen des Präpolymers wird der Vernetzungsgrad der UV-Paste bestimmt. Zur Änderung der Viskosität der Farbe werden Monomere den Präpolymeren zugesetzt, somit kann auf den Einsatz von leicht flüchtigen Verdünnungsmitteln verzichtet werden. Gleichzeitig werden die Oberflächeneigenschaften des UV-Films wie Härte, Glanz und Flexibilität von den Monomeren beeinflusst.

2.2.3.3 Immobilisierung auf Graphitelektroden über Carbodiimid

Der Immobilisierung von Enzymen auf Graphitelektroden über 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid (EDC), das primäre und sekundäre Amine mit Carboxylatresten verknüpft (Abb. 7), wurde ein elektrochemischer Aktivierungsschritt vorgeschaltet. Hierdurch wurden die Elektrodenoberflächen dekontaminiert, die Konzentration an funktionellen Gruppen erhöht und die aktive Fläche durch Aufrauung vergrößert (Csöregi *et al.*, 1993). Zur Aktivierung durchliefen die Elektroden für 10 min cyclisch einen Potentialbereich von 0 bis 1,8 V mit einer Scanrate von 50 mV/s in 0,1 M KPP-Puffer pH 7. Um eine Mediatorschicht abzulagern, wurde dieses Verfahren dahingehend modifiziert, daß ein Bereich von 0 bis 2,5 V in 15 Cyclen mit einer Geschwindigkeit von 200 mV/s in einer wäßrigen 0,1 M Kaliumhexacyanoferrat(III)-Lösung durchfahren wurde. Unabhängig von der elektrochemischen Vorbehandlung wurden die Elektroden anschließend gründlich mit H₂O dest. abgespült und für 90 min in eine gerührte 0,15 M EDC-Lösung in 50 mM Natriumacetat-Puffer pH 5,5 getaucht. Nach erneutem Abspülen wurden 5 µl Enzymlösung aufpipettiert und die Elektroden bei RT getrocknet.

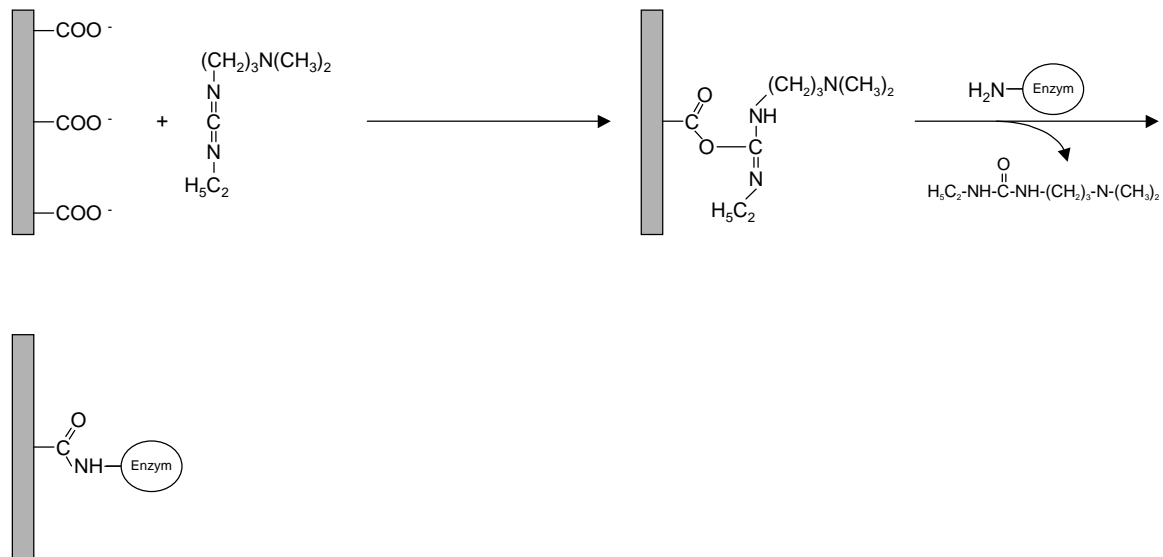


Abb. 7: Immobilisierung auf Graphitelektroden über EDC

2.2.3.4 Immobilisierung auf GOPS-aktivierte Träger

Über das Silanisierungsreagenz 3-Glycidoxypropyltrimethoxysilan (GOPS) lassen sich Oxirangruppen auf einer Glasoberfläche einführen, die direkt mit den Aminogruppen von Enzymen reagieren oder in sauren Medien zu einem vicinalen

Diol hydrolysiert werden. Das Diol kann wiederum durch Natrium-meta-Periodat aktiviert und zur Kopplung primärer Amine eingesetzt werden (Abb. 8).

Die Silanisierung von CPG (75 – 125 μm mesh) sowie der nicht-porösen Glas-Beads (150 – 212 μm) erfolgte nach der Methode von Plant *et al.*, (1991):

Die Glasträger wurden zunächst in heißer halbkonzentrierter Schwefelsäure für eine Stunde bei 100°C gereinigt und im Anschluß mit destilliertem Wasser säurefrei gewaschen. Nach der Überführung der Beads in einen Rundkolben wurden sie mit einer 10%igen GOPS/KPP-Lösung pH 7 (v/v) bis zum Zweifachen ihres Schüttvolumens überschichtet und über Nacht unter Rückfluß (100°C) bei mäßigem Rühren silanisiert. Überschüssiges Silanisierungsreagenz wurde durch Waschen mit destilliertem Wasser entfernt. Der auf der Oberfläche der Träger eingeführte Oxiranring wurde durch einstündiges Kochen in 80%iger Essigsäure zum Diol hydrolysiert, nach einem weiteren Spülschritt wurden die Beads für eine Stunde bei 80°C getrocknet.

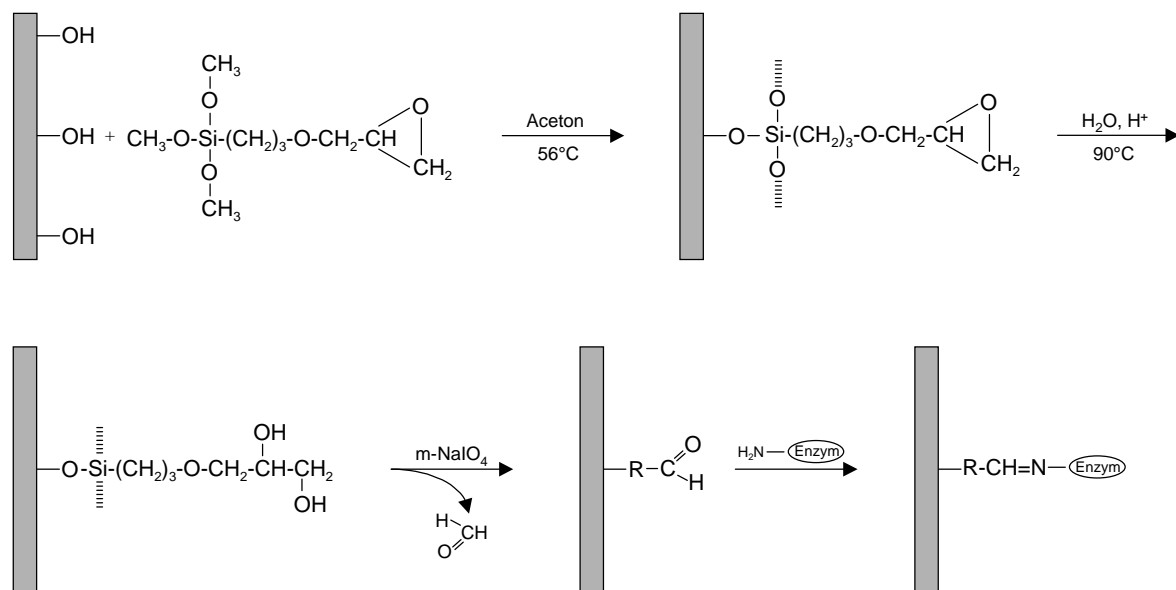


Abb. 8: Enzymimmobilisierung auf einer GOPS-aktivierten Glasoberfläche

Für die weitere Aktivierung wurden 300 mg Trägermaterial mit 3 ml Natrium-meta-Periodat-Lösung (4,25 mg/ml) in 80%iger Essigsäure 90 min bei RT unter Lichtausschluß inkubiert. Das Glas wurde mit Clark & Lubs pH 8 gewaschen und anschließend 2 ml XOD-Lösung (2mg/ml) in C&L pH 8 mit einem Zusatz von 0,5 mM EDTA über Nacht bei 4°C unter mäßigem Rühren immobilisiert.

2.2.4 Elektrochemische Detektion

2.2.4.1 Amperometrie

Bei der Amperometrie handelt es sich um eine potentiostatische Technik. Durch ein vorgewähltes Potential kommt es zu einem erzwungenen Elektronentransfer zwischen einer elektrochemisch aktiven Spezies und einer Elektrode. Der resultierende Strom I ist ein Maß für die pro Zeiteinheit an der Elektrodenoberfläche umgesetzten Moleküle.

$$I = zFA \cdot j \quad (5)$$

Der Strom ist der Anzahl der pro Molekül übertragenen Elektronen z , der Faraday-Konstante F , der Elektrodenfläche A und der Anzahl der pro Zeiteinheit an der Elektrode umgesetzten Moleküle j proportional (Gl. 5). Der Transport der elektrochemisch aktiven Substanz kann dabei durch Diffusion, Konvektion und Migration erfolgen. Für Reaktionen, bei denen der Elektronentransfer durch die Phasengrenze im Vergleich zum Massentransport zur Elektrodenoberfläche durch Diffusion sehr schnell abläuft, ergibt sich Gleichung 6:

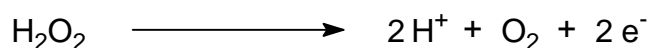
$$I_D = \frac{zFDc_0}{\sigma} \quad (6)$$

Der Massentransport wird durch den Diffusionskoeffizienten D , die Dicke der Diffusionsschicht an der Phasengrenze Elektrode/Lösung σ und die Konzentration der elektrochemisch aktiven Substanz c_0 in der Lösung bestimmt. Der allein durch die Diffusion begrenzte Strom wird daher als Diffusionsgrenzstrom I_D bezeichnet. Da der Diffusionskoeffizient und damit auch der Diffusionsgrenzstrom temperaturabhängig ist, müssen solche Einflüsse bei amperometrischen Messungen mit berücksichtigt werden.

Wählt man das Elektrodenpotential negativer als das Standardpotential E° der redox-aktiven Substanz (Depolarisator), so wird seine oxidierte Form reduziert. Im umgekehrten Fall (Elektrodenpotential positiver als Standardpotential) läuft bevorzugt die Oxidation der reduzierten Form ab.

Für amperometrische Messungen wird im allgemeinen das Elektrodenpotential sehr viel kleiner oder größer als das Standardpotential gewählt, so daß nicht der Elektronentransfer durch die Phasengrenzfläche, sondern die Transportprozesse geschwindigkeitsbestimmend sind. Die Messungen können mit einem Zwei- oder Drei-Elektrodensystem durchgeführt werden. Im Drei-Elektrodensystem wird der Strom über eine Hilfselektrode abgeführt, die Referenzelektrode bleibt damit stromlos und Potentialschwankungen können auf diese Weise vermieden werden.

Die in dieser Arbeit beschriebenen amperometrischen Messungen wurden ausschließlich im Drei-Elektrodensystemmodus durchgeführt. An der Arbeitselektrode wurde das durch die enzymatische Umsetzung des jeweiligen Analyten produzierte Wasserstoffperoxid oxidiert:



Hierfür wurde ein Elektrodenpotential von +300 bis +600 mV gegen die interne Platin-Referenzelektrode angelegt.

2.2.4.2 Cyclische Voltametrie

Bei der cyclischen Voltametrie wird ein Potentialbereich cyclisch mit einer konstanten Spannungsänderungs-Geschwindigkeit gescannt; als Meßsignal wird bei diesem Verfahren der Strom aufgezeichnet. Die cyclische Voltametrie eignet sich zur Charakterisierung der Sensoroberfläche (Adsorptionsprozesse) und zur Bestimmung thermodynamischer und kinetischer Daten der Elektrodenreaktion. Bei der Auftragung des gemessenen Stroms gegen die angelegte Spannung erhält man charakteristische *Peak-Spektren*, die als cyclische Voltamogramme (CV) bezeichnet werden. Bei der Reaktion eines Redoxpaares an einer Elektrode kommt es durch die Oxidation/Reduktion der Verbindung zur Ausbildung einer anodischen und kathodischen Stromwelle in den entsprechenden Potentialbereichen, in denen für die Elektrode selbst nur der Kapazitätsladestrom der elektrochemischen Doppelschicht beobachtet wird.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten cyclischen Voltamogramme wurden mit dem Potentiostaten/Galvanostaten Modell 263A (EG&G, Bad Wildbad) aufgenommen. Als Referenzelektroden dienten Ag/AgCl-Bezugselektroden (Ingold Meßtechnik GmbH, Steinbach), als Hilfselektrode ein Platindraht.

2.2.5 Fließinjektions-Analyse

Die von Ruzicka und Hansen 1975 vorgestellte Fließinjektions-Analyse (FIA) basiert auf der Injektion eines definierten Probenvolumens in einen kontinuierlichen, unsegmentierten Trägerstrom. Die Probenzone erfährt während des Transportes durch das Fließsystem eine chemische oder physikalische Veränderung, die durch einen geeigneten Detektor registriert wird. Als automatisiertes System hat sich die FIA-Technologie in vielen analytischen Bereichen etabliert, da alle Detektionsprinzipien integriert werden können, für die geeignete Durchflußmeßgeräte zur Verfügung stehen. Des weiteren können diese Systeme aufgrund ihrer Flexibilität einfach an individuelle Fragestellungen adaptiert werden.

In der Fließinjektions-Analyse kommt es im Vergleich zu chromatographischen Analysetechniken nicht zu einer Retention der Probenkomponenten in einer Trennsäule, sondern zu einer Umsetzung der injizierten Probe mit Reagenzien im Trägerstrom. Als charakteristische Kenngröße dient der Dispersion-Koeffizient D_{Dis} , über den die Verteilung (Dispersion) der Probe im Trägerstrom angegeben wird. Die Dispersion ist von der Fließgeschwindigkeit, Schlauchlänge, -durchmesser, -führung (gerade oder gewunden) und vom Probenvolumen abhängig und läßt sich mathematisch beschreiben als:

$$D_{\text{Dis}} = \frac{c_0}{c_T} \quad (7)$$

c_0 entspricht dabei der Konzentration der injizierten Probe und c_T der Trägerstrom-Analyt-Konzentration am Detektor. Die Konstanz der Dispersion ist die Voraussetzung für die Reproduzierbarkeit der Messungen in einem FIA-System. Durch die exakte zeitliche Kontrolle aller Vorgänge (Reaktionen) im diesem System, muß die Einstellung des thermodynamischen Gleichgewichtszustandes nicht abgewartet werden, so daß eine höhere Probenfrequenz erreicht wird.

2.2.5.1 Enzymatische Detektion in der FIA

Durch den Einsatz von biochemischen Komponenten wie Antikörpern oder Enzymen läßt sich die Selektivität und Sensitivität des analytischen Systems erhöhen. Bei diesen Reaktionen kann im Idealfall auf die Zugabe weiterer Reagenzien verzichtet werden. Durch die Immobilisierung des biochemischen

Erkennungssystem an einen festen Träger wird ein kontinuierlicher Einsatz als Detektor im Fließsystem möglich. Wie unter 2.2.3 beschrieben, kann die Immobilisierung direkt auf der Oberfläche des Transducers oder aber auf anderen Trägermaterialien wie porösen Glas-Beads, Ionenaustauschern oder Polymeren, die sich in säulenförmigen Reaktoren befinden, durchgeführt werden. Diese Reaktoren werden im Fließsystem vor dem Detektor platziert, so daß es zu einer räumlichen Trennung der biochemischen Erkennungsreaktion und der Meßwerterfassung kommt. Der Vorteil dieser Systeme gegenüber den *klassischen* Biosensoren ist in der größeren Oberfläche begründet, über die eine größere Menge der Biokomponente gebunden werden kann, wodurch sich eine Reduzierung des Meßsignals durch Inaktivierung der biochemischen Komponente im Vergleich zum planaren Transducersystem zeitlich verzögert (Diffusionskontrolle). Zudem kann eine nahezu quantitative Substratumsetzung erreicht werden, was zu einer Signalerhöhung führt.

2.2.5.2 Aufbau des Fließinjektions-Systems

Die funktionelle Erprobung der entwickelten Dickschicht-Biosensoren sowie der Enzymreaktoren wurde in einem Fließinjektions-Analysesystem, wie in Abb. 9 skizziert, durchgeführt. Probe und Trägerstrom (Carrier) wurden jeweils über eine peristaltische Pumpe mit konstanter Drehzahl transportiert. Mit Hilfe eines Injektionsventils wurde ein Probenvolumen von 30 µl in den Carrier injiziert. Durch die Integration von zwei 2/3-Wegeventilen konnte das System im Ein- oder Zweikanalmodus betrieben werden.

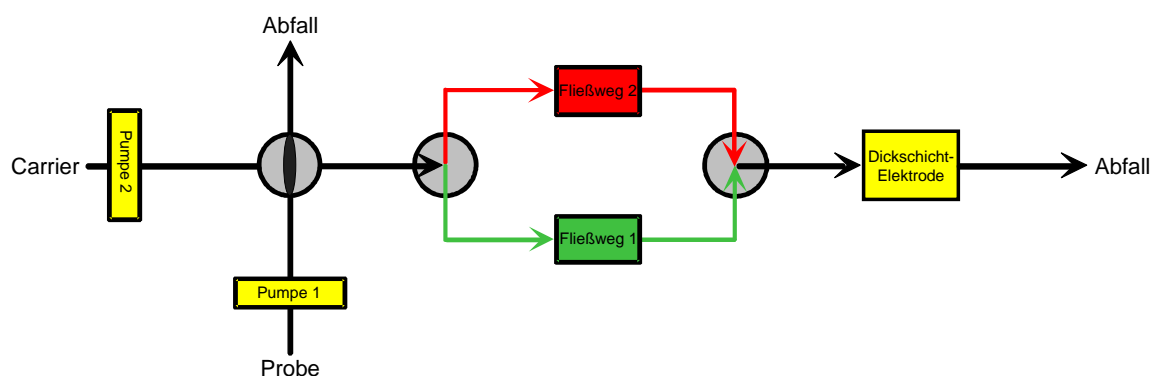


Abb. 9: Schematische Darstellung des FIA-Systems zur Nukleotid-Analytik

Die amperometrische Detektion erfolgte an einer Dickschichtelektrode, die sich in einer Plexiglas-Durchflußzelle mit einem Volumen von etwa 30 µl befand. Bei Verwendung von Enzymelektroden wurde das Fließsystem ausschließlich im Ein-Kanal-Modus betrieben, während beim Einsatz von Enzymreaktoren in den Fließweg 2 ein weiterer mit CPG beschickter Reaktor integriert wurde. Die Glas-Beads in diesem Reaktor waren mit BSA immobilisiert worden, so daß über den zweiten Kanal die Bestimmung von Interferenzen möglich wurde.

2.2.6 Amperometrische Bestimmung von ATP

Zur enzymatischen Bestimmung von ATP wurde das bereits unter 1.5.1.1 beschriebene Glucose-Oxidase/Hexokinase-System eingesetzt, in dem beide Enzyme um das Substrat Glucose konkurrierten. Die Detektion erfolgte amperometrisch über das in der Reaktion der Glucose-Oxidase gebildete H_2O_2 .

Die Vorschrift zur Immobilisierung auf Platinelektroden mittels Glutardialdehyd wurde aufgrund des Bi-Enzymsystems folgenderweise modifiziert:

Enzymlösung: 7 µl GOD (600 U/ml) + 7 µl Hexokinase (300 U/ml)

BSA-Lösung: 3 µl 100 mg/ml

Glutardialdehyd: 3 µl 2,5%ig (v/v)

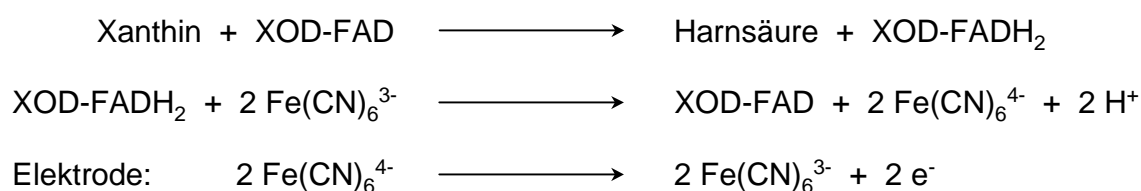
Alle Lösungen wurden in 0,1 M KPP-Puffer pH 7,5 angesetzt und vorsichtig in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß vermischt. 2 µl dieser Lösung wurden im Anschluß auf die Arbeitselektrode eines Platin-Einfachsensors (Abb. 4a) pipettiert, der als Detektionseinheit in das FIA-System integriert wurde.

Dem Carrierstrom wurde Glucose zugesetzt, so daß durch die von der GOD katalysierte Reaktion ein kontinuierliches Grundsignal erzeugt wurde. Durch die Injektion einer ATP-haltigen Probe trat eine Konkurrenz der beiden Enzyme um die im Puffer vorliegende Glucose ein, da der Zucker in Gegenwart des Nukleotids stöchiometrisch durch die Hexokinase phosphoryliert wurde. Je höher die ATP-Konzentration der Probe war, desto mehr Glucose konnte phosphoryliert werden und desto stärker wurde das Grundsignal der GOD-Reaktion herabgesetzt. Die ATP-Quantifizierung erfolgte aus Differenzbildung dieser beiden Signale.

2.2.7 Amperometrische Bestimmung von Xanthin

Die amperometrische Detektion basierte auf der Reaktion der Xanthin-Oxidase (XOD) mit molekularem Sauerstoff (s. S. 14) oder Kaliumhexacyanoferrat als Elektronenakzeptoren.

In Gegenwart von Sauerstoff wurde Xanthin zu Harnsäure und Wasserstoffperoxid umgesetzt, aus dessen Oxidation ein Stromfluß resultierte, der zur Quantifizierung von Xanthin herangezogen wurde. Der Mediator wurde als Elektronenakzeptor eingesetzt, um eine Xanthindetektion bei deutlich geringeren Potentialen als +600 mV zu ermöglichen und eventuelle Interferenzen durch weitere elektrochemisch aktive Substanzen weitgehend zu unterdrücken. Die XOD enthält eine FAD-Gruppe, die bei der Substratumsetzung reduziert wird (Hille, 1994). Mit Hilfe des Hexacyanoferrats wurde die prosthetische Gruppe re-oxidiert und das Enzym somit wieder für die nächste Umsetzung regeneriert. Die Quantifizierung des Xanthins erfolgte in diesem Fall über den Stromfluß, der durch die Oxidation des Mediators an der Elektrode erzeugt wurde.



2.2.7.1 XOD-Elektroden

Platinelektroden

Auf Platin-Dickschichtelektroden wurde die Xanthin-Oxidase ausschließlich über UV-Polymerisation immobilisiert. Dazu wurden 10 µl einer XOD-Lösung (200 mg/ml) und verschiedene Additive mit der UV-Paste vermischt und anschließend auf die Arbeitselektrode aufgedruckt. Die resultierenden Biosensoren wurden hinsichtlich ihres Interferenzverhaltens sowie ihrer Stabilität und Sensitivität im Ein-Kanal-Fließsystem untersucht.

Graphitelektroden

Eine XOD-Konzentration von 4 mg/ml wurde über die Carbodiimid-Methode auf aktivierte Graphit-Dickschichtelektroden immobilisiert. Auch diese Sensoren wurden

zur Untersuchung ihrer Stabilität und ihres Ansprechverhaltens auf interferierende Substanzen als Detektoren in das FIA-System integriert.

2.2.7.2 XOD-Reaktoren

150 mg CPG wurden - wie unter 2.2.3.1 beschrieben - mit APTS silanisiert und mit Glutardialdehyd aktiviert. Anschließend wurden 2 ml XOD-Lösung (2 mg/ml) über Nacht bei 4°C immobilisiert. Als Reaktor diente ein Schlauch-Verbindungsstück, das zunächst einseitig mit einer porösen Polyethylenmembran verschlossen und mittels Ansaugen luftblasenfrei mit dem Immobilisat beschickt wurde. Nach dem Verschließen mit einer zweiten Membran wurden die Reaktoren bis zu ihrer Verwendung in Clark & Lubs-Puffer pH 8 mit einem Zusatz von 0,5 mM EDTA bei 4°C gelagert. Zur Bestimmung unspezifischer Signale wurde ein zweiter Reaktor mit CPG beschickt, auf dem eine Lösung von 2 mg/ml BSA immobilisiert worden war. Im Zwei-Kanal-FIA-System (Abb. 9) wurden die XOD-Reaktoren hinsichtlich ihrer Stabilität und Sensitivität charakterisiert.

2.2.8 Kapillarelektrophorese

2.2.8.1 Grundlagen

Unter dem Überbegriff Kapillarelektrophorese (CE) faßt man verschiedene Trenntechniken zusammen, dabei zählt neben der Kapillargelelektrophorese, der micellaren elektrokinetischen Chromatographie, Isotachophorese und isoelektrischer Fokussierung, die Kapillarzonenelektrophorese (CZE) zu dem zur Zeit am häufigsten verwendeten Verfahren. Bei der CZE ist die Kapillare ausschließlich mit Elektrolyt gefüllt und die Trennung beruht auf den Mobilitätsdifferenzen der Probenbestandteile. In Abbildung 10 ist schematisch der Aufbau einer CE-Apparatur dargestellt. Über dünne Kapillaren (Innendurchmesser 25 -100 µm) aus amorphem Siliziumdioxid (*fused silica*) werden zwei Puffergefäße überbrückt, zwischen denen eine Spannung von bis zu 30 kV angelegt werden kann. Die Injektion von einigen nL der Probe am anodischen Ende der Kapillare kann hydrodynamisch über Druck oder elektrokinetisch erfolgen. Das Anlegen einer Spannung und das sich daraufhin ausbildende elektrische Feld in der Kapillare führt zur Mobilisierung der Ionen, die sich mit konstanter Geschwindigkeit bewegen.

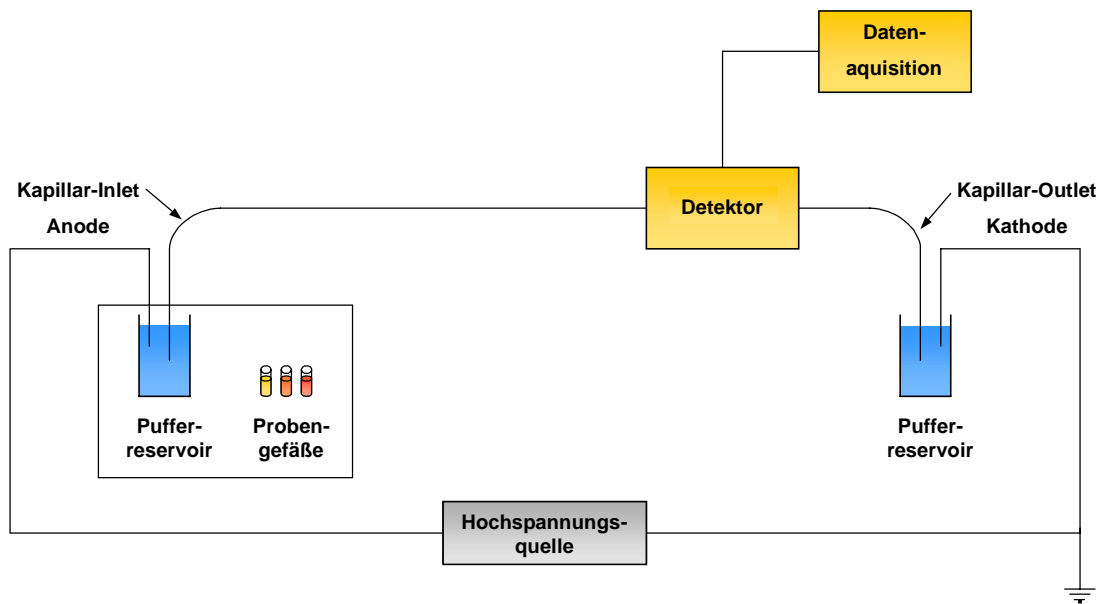


Abb. 10: Schematischer Aufbau einer CE-Apparatur

Mit zunehmender Spannung und damit wachsender Feldstärke E erhöht sich die Wanderungsgeschwindigkeit u der Ionen:

$$u = \mu_{eff} \cdot E \quad (8)$$

Die effektive Mobilität μ_{eff} ist eine Eigenschaft eines Partikels, die proportional von der Ladung q und invers proportional von den Reibungskräften, die auf das Molekül einwirken, abhängig ist. Die elektrische Kraft F_{el} kann beschrieben werden durch:

$$F_{el} = q \cdot E \quad (9)$$

Die Reibungskraft F_R , die auf ein sphärisches Ion wirkt, lässt sich angenähert durch das *Stoke'sche Gesetz* wiedergeben:

$$F_R = 6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r \cdot u \quad (10)$$

Hierbei ist η die dynamische Viskosität und r der *Stoke'sche Radius*, der auch die Solvathülle umfaßt. Während der Elektrophorese wird ein *steady state* erreicht, wenn

die in entgegengesetzte Richtungen wirkenden Kräfte identisch sind:

$$q \cdot E = 6 \cdot \pi \cdot r \cdot \eta \cdot u \quad (11)$$

Nach Umstellen von Gleichung 11 ergeben sich für die effektive Mobilität μ_{eff} die bereits in Gleichung 4 darstellten Abhängigkeiten von der Ladung und vom Radius des Analyten.

$$\mu_{eff} = \frac{q}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r} \quad (4)$$

Aus dieser Formel geht hervor, daß die Mobilität sowohl von der Ladung als auch von der Größe eines Partikels abhängt; kleine hoch geladene Moleküle zeichnen sich durch eine hohe Mobilität aus, während große Moleküle mit einer minimalen Ladung sich nur sehr langsam im elektrischen Feld bewegen.

In der Kapillarzonenoelektrophorese werden Trennungen mit normaler Polarität durchgeführt, wenn die Probe am anodischen Ende injiziert wird und das Detektorfenster sich auf der kathodischen Seite befindet. Mit der elektrophoretischen als einziger wirksamen Kraft sollten die Kationen den Detektor passieren, während neutrale Substanzen statisch bleiben und die Anionen sich in entgegengesetzter Richtung vom Detektor entfernen sollten. Die Tatsache jedoch, daß unter optimierten Bedingungen auch neutrale und negativ geladene Substanzen detektiert werden, macht deutlich, daß neben der elektrophoretischen noch weitere Kräfte die Mobilität der Probenbestandteile beeinflussen.

2.2.8.2 Elektroosmotischer Fluß (EOF)

Der elektrophoretischen Wanderung ist stets eine zweite Bewegung, der elektroosmotische Fluß (EOF), überlagert. Dieser verursacht einen Fluß der gesamten Elektrolytlösung und führt damit dazu, daß alle Substanzen unabhängig von ihrer Ladung auf der kathodischen Seite detektiert werden können.

Die verwendeten *fused silica* Kapillaren tragen durch Dissoziation negative Oberflächenladungen, denen entgegengesetzt geladene Ionen in der Flüssigkeit gegen-

überstehen. Es bildet sich eine Doppelschicht aus, in der die Kationen überwiegen, die sich zunächst in einer starren und in etwas weiterer Entfernung von der Oberfläche in einer diffusen Schicht anordnen (Abb. 11A). Aufgrund dieser Ladungsverteilung baut sich ein Potential auf, das sich nach der Theorie von Stern in zwei Regionen untergliedert: das Potential nimmt in der starren Grenzschicht linear und in der diffusen exponentiell ab (Abb. 11B).

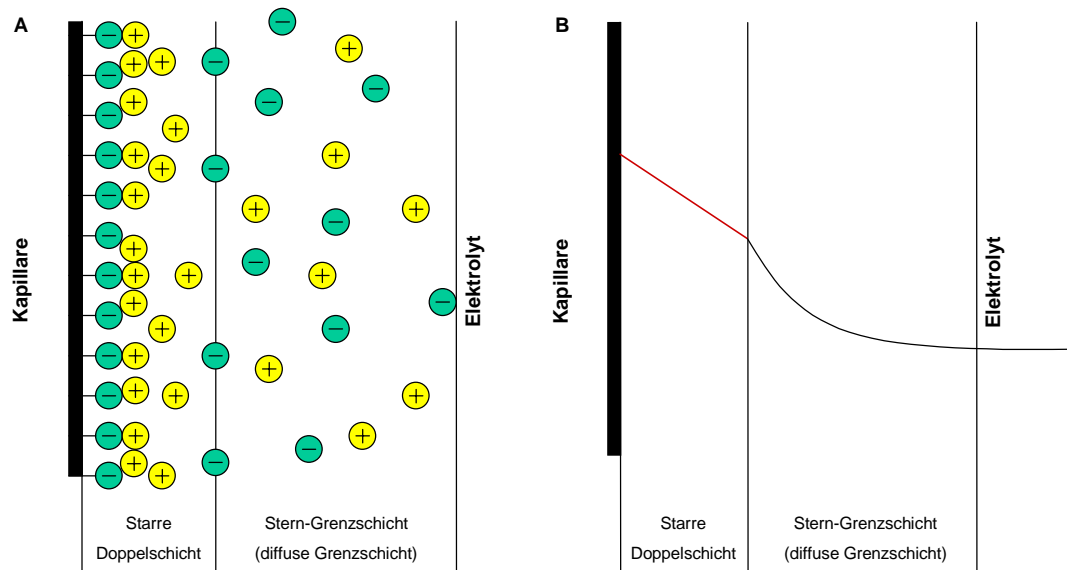


Abb. 11: Ladungsverteilung (A) und Potentialverlauf (B) an der Phasengrenze Kapillare/Elektrolyt

Die exponentielle Abnahme in der äußeren Schicht ist für den EOF verantwortlich und wird als Zeta-(ζ)-Potential bezeichnet. Unter dem Einfluß eines elektrischen Feldes migrieren die Kationen der diffusen Schicht einschließlich ihrer Hydrathülle in Richtung der Kathode. Über Wasserstoffbrückenbindungen, die sich zwischen Wassermolekülen in der diffusen Schicht und im Elektrolyten ausbilden, wird ein Fluß der gesamten Pufferlösung zur Kathode induziert. Der EOF dient somit als ein Mechanismus, der sowohl kationische als auch neutrale und anionische Moleküle zum Detektor transportiert, wobei die Trennung der Probe letztendlich durch die unterschiedlichen elektrophoretischen Mobilitäten der Analyte bestimmt wird.

Die Wanderungsgeschwindigkeit des elektroosmotischen Flusses u_{EOF} läßt sich vereinfacht mit Hilfe der Helmholtz-Gleichung beschreiben:

$$u_{\text{EOF}} = \mu_{\text{EOF}} \cdot E = \frac{E \cdot \varepsilon \cdot \zeta}{4 \cdot \eta \cdot \pi} \quad (12)$$

Der EOF ist damit umgekehrt proportional der Viskosität η des Elektrolyten, proportional seiner Dielektrizitätskonstante ε , der angelegten Feldstärke E und dem Zeta-Potential. Der elektroosmotische Fluß in Siliziumdioxid-Kapillaren wird mit steigender Konzentration des Elektrolyten herabgesetzt und wächst mit dem pH-Wert an, da mit steigendem pH der Dissoziationsgrad der Oberflächensilanolgruppen erhöht wird. In Kapillaren mit einem Innendurchmesser von 25 bis 100 μm bildet sich durch den EOF ein nahezu ideales pfropfenförmiges Strömungsprofil aus, das im Gegensatz zu einem hydrodynamischen Fluß kaum zu einer Bandenverbreiterung beiträgt.

Unter Berücksichtigung des EOFs verändert sich die Gleichung zur Bestimmung der Wanderungsgeschwindigkeit eines Analyten folgenderweise:

$$u_i = \mu_{\text{eff}} \cdot E = (\mu_{EP} + \mu_{EOF}) \cdot E \quad (13)$$

Die resultierende Mobilität wird hierbei sowohl durch die elektrophoretische Beweglichkeit μ_{EP} , die ausschließlich durch das angelegte elektrische Feld hervorgerufen wird, als auch durch die elektroosmotische Mobilität μ_{EOF} bestimmt.

2.2.8.3 Detektion

Die Detektion in der CE wird in den meisten Fällen optisch direkt in der Kapillare durchgeführt, nur in seltenen Fällen, wie z. B. bei der Kopplung mit einem Massenspektrometer, erfolgt der Nachweis der getrennten Analyte außerhalb der Kapillare. Im Gegensatz zu chromatographischen Verfahren wandern die Probenbestandteile mit unterschiedlicher Geschwindigkeit durch das Detektionsfenster, daher müssen bei einer quantitativen Auswertung über die Peakflächen die unterschiedlichen Verweilzeiten der Substanzen im Detektionsbereich berücksichtigt werden. Für die optische Detektion steht nur die mittlere Weite des Kapillarinneendurchmessers als Schichtdicke zur Verfügung, so daß die Empfindlichkeit im Vergleich zu anderen Systemen geringer ausfällt. Kommerzielle CE-Systeme sind sowohl mit UV- als auch mit Fluoreszenz-Detektoren verfügbar.

2.2.9 Trennung von Xanthin über CE

Für die Trennung von Xanthin mittels Kapillarelektrophorese wurden ungecoatete *fused silica* Kapillaren mit folgenden Dimensionen verwendet:

Innendurchmesser (ID): 50 μm

Gesamtlänge: 30 cm

Inlet-Detektor-Distanz: 22 cm

Die Kapillaren wurden zunächst konditioniert, indem sie 30 min mit 1 M NaOH und anschließend jeweils 10 min mit H_2O dest. und CE-Puffer gespült wurden. Die Probe wurde über Druck (4 s) injiziert, durch Anlegen einer Spannung (10 - 20 kV) getrennt und anschließend über UV-Absorption oder indirekte Laser-induzierte Fluoreszenz detektiert. Zwischen den Injektionen wurde die Kapillare nochmals jeweils für 2 min mit 0,1 M NaOH, H_2O dest. und CE-Puffer gespült, um so die Adsorption von Probenbestandteilen an der Kapillaroberfläche zu vermeiden, die zu einer Veränderung des elektroosmotischen Flusses und somit zu verlängerten Migrationszeiten geführt hätte.

2.2.9.1 UV-Detektion

Die UV-Detektion in einem Wellenlängenbereich zwischen 205 und 280 nm zählt zu dem am häufigsten verwendeten optischen Nachweisverfahren für Xanthin, da die Nukleobase in diesem Bereich eine hohe Absorption aufweist und der UV-Modus im Gegensatz zur direkten Fluoreszenz-Detektion keine weiteren Derivatisierungsschritte erfordert.

In der vorliegenden Arbeit wurden alle CE-Trennungen mit UV-Detektion bei 280 nm durchgeführt.

2.2.9.2 Indirekte Laser-induzierte Fluoreszenz-Detektion

Im allgemeinen kommen in der Analytik Detektionsmethoden zum Einsatz, die auf chemischen oder physikalischen Eigenschaften des Analyten basieren und den Anforderungen der jeweiligen Anwendung entsprechen. So wird die UV-Detektion in der Regel zum Nachweis von stark absorbierenden Substanzen verwendet oder die Fluoreszenz-Detektion zur Bestimmung von geringen Konzentrationen leicht zu derivatisierender Stoffe. Neben diesen direkten Verfahren besteht aber auch die

Möglichkeit Analyte, die die nötigen physikalischen oder chemischen Eigenschaften nicht besitzen, indirekt nachzuweisen, indem dem Puffer eine leicht zu detektierende Spezies zugesetzt wird, die ein konstantes hohes Grundsignal erzeugt. Das Prinzip der indirekten Detektion basiert auf einem Verdrängungsmechanismus, bei dem unter Einhaltung der Elektroneutralität ein Teil der signalgebenden Moleküle gegen den eigentlichen Analyten innerhalb der Probenzone ausgetauscht wird. Durch diesen Prozeß wird das Grundsignal verringert, was sich in der Form eines negativen Peaks beobachten läßt (Abb. 12).

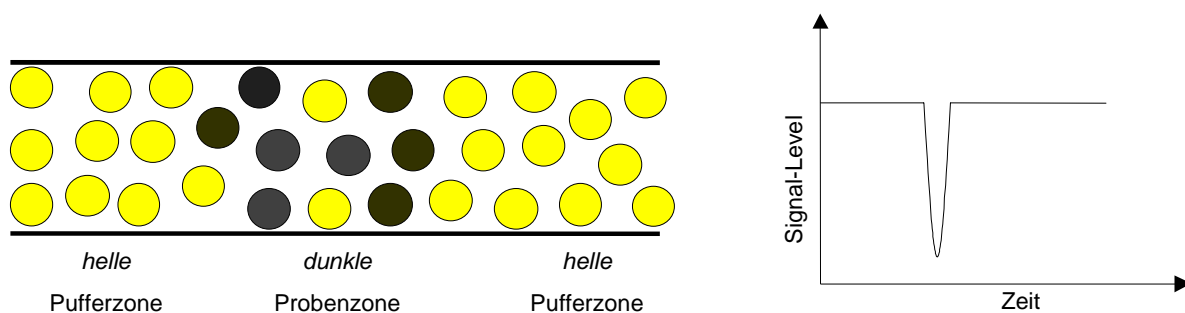


Abb. 12: Schematische Darstellung des Prinzips der indirekten Detektion

Für die durchgeführten Untersuchungen zur indirekten LIF-Detektion von Xanthin wurde dem CE-Puffer Fluorescein als signalerzeugende Substanz zugesetzt, deren Absorptionsmaximum von 492 nm sehr gut mit der Anregungswellenlänge eines Argon-Ionenlasers (488 nm) übereinstimmt. Durch die mit einer Wellenlänge von 520 nm emittierte Fluoreszenz wurde ein kontinuierliches Grundsignal erzeugt, das bei der Injektion und anschließenden Trennung von Xanthin herabgesetzt wurde.

2.2.10 Mikrosysteme

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden integrierte mikrofluide Systeme verwendet, in denen ausschließlich elektroosmotische Effekte zum Flüssigkeitstransport ausgenutzt wurden. Die Herstellung dieser Chips beschränkte sich aus diesem Grund auf die Erzeugung eines Kapillarnetzwerks in einem planaren Glassubstrat.

2.2.10.1 Herstellung mikrofluider Strukturen

Die Herstellung eines Netzwerkes sich kreuzender Kapillaren in Glas erfolgte über standardisierte photolithographische Techniken und naßchemisches Ätzen (Fan und Harrison, 1994). In Abbildung 13 sind die wesentlichen Schritte des Fabrikationsprozesses dargestellt.

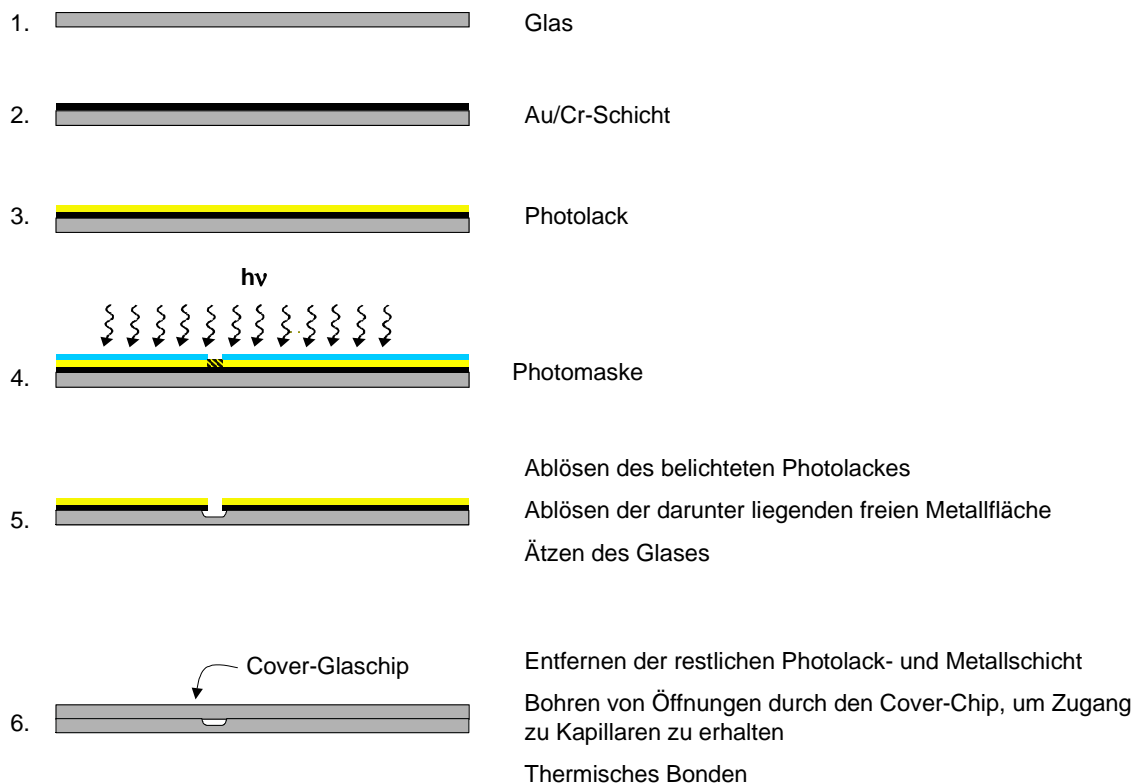


Abb. 13: Herstellungsprozeß mikrofluider Analysensysteme

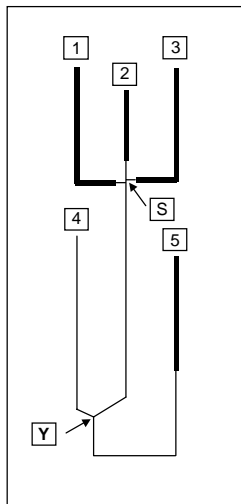
Der gereinigte Glaschip wurde zunächst mit einer Chrom/Gold-Maske beschichtet, auf die mittels Spin-Coating ein Photolack aufgebracht wurde. Über eine Photomaske erfolgte die Belichtung nur einzelner Regionen, in denen sich der Lack bis zur Metallschicht hinunter ablöste, während die Flächen, die der Belichtung nicht ausgesetzt waren, gegen die hierfür verwendete Lösung inert blieben und so feine 10 μm breite Linien entstanden. Im nächsten Schritt wurde die in diesen Linien frei liegende Metallfläche bis zum Glaschip geätzt, der anschließend durch eine konzentrierte Mischung aus Fluß- und Salpetersäure strukturiert wurde. Der Glaschip wurde hierbei isotrop geätzt, so daß ein Teil des Glases auch seitlich unter der Metallmaske entfernt wurde. Aus diesem Verfahren resultierten abgerundete Kapillar-

seitenwände, wohingegen der Boden eben blieb. Das Ausmaß der horizontalen Ausdehnung des Kanals unter dem Metall wurde durch die vertikale Ätztiefe bestimmt. Im allgemeinen waren die in vertikaler und horizontaler Richtung geätzten Distanzen identisch, so daß mit einer Maskenlinienbreite von 10 µm und einer Tiefe von 10 µm an der Oberfläche 30 µm breite Kanäle erhalten wurden. Die ersten fünf Arbeitsschritte der Chip-Herstellung wurden aufgrund der benötigten Technik und Reinraumbedingungen extern von der Alberta Microelectronic Corporation (AMC) durchgeführt. Zur Formung von geschlossenen Kanälen wurden durch einen zweiten photolithographisch unbehandelten Chip zunächst Öffnungen im Durchmesser von etwa 3 mm gebohrt, anschließend wurden beide Glasplatten so übereinander angeordnet, daß die Enden der geätzten Kanäle jeweils unter dem Mittelpunkt einer der Öffnungen im Cover-Chip lagen. Durch thermisches Bonden wurde diese Positionierung abschließend fixiert (Fan und Harrison, 1994).

Um das Einführen der Platinelektroden zur Potentialerzeugung über bestimmte Abschnitte des Kapillarsystems zu erleichtern, wurden Pipettenspitzen mittels Epoxylebstoff über den Öffnungen im Cover-Chip aufgebracht. Die Steuerung der Relais der Hochspannungsquellen sowie die Aquisition der Daten erfolgte über hausintern (University of Alberta, Edmonton, Kanada) unter LabVIEW geschriebene Programme.

2.2.10.2 Mikrochip-Kapillarelektrophorese

Alle Untersuchungen zur Trennung von Xanthin mittels eines integrierten mikrofluiden Systems wurden mit dem POCRE-1-Chip (*Post Column Reaction Chip*) durchgeführt. Das Layout des Kapillarnetzwerks und die Dimensionen der einzelnen Kanäle sind in Abbildung 14 bzw. Tabelle 5 angegeben. Die Schnittpunkte der beiden Seitenkanäle 1 und 3 mit dem Hauptkanal 2 lagen 100 µm auseinander. Durch diese Anordnung wurde ein sogenanntes *doppel-T* gebildet, über das Injektionen geometrisch definierter Probenvolumina möglich waren.



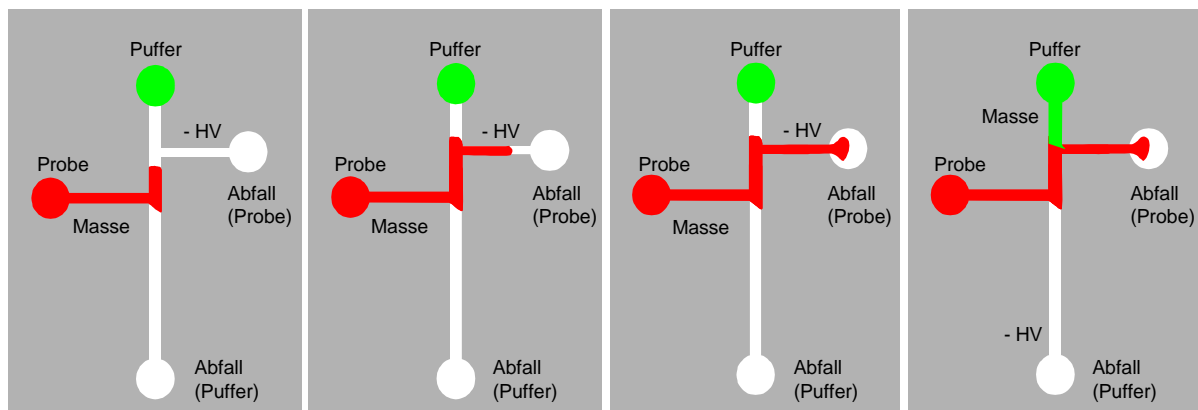
Kanal	Tiefe [μm]	Länge [mm]	Breite [μm]
1 - S	10	25,41	230/30
3 - S	10	25,31	230/30
2 - S	10	11,87	230/30
S - Y	10	38,81	30
4 - Y	10	30,51	30
Y - 5	10	47,71	230/30

Tab. 5: Dimensionen des POCRE-1-Chips

Links: Abb. 14: Layout des POCRE-1-Chips

2.2.10.3 Injektion und Separation

Die elektrokinetische Injektion einer Probe über die *doppel-T-Struktur* ist in Abbildung 15 sequenziell dargestellt.

Abb. 15: Elektrokinetische Injektion über die *doppel-T-Struktur*

Zunächst wurde durch Anlegen einer Spannung zwischen den beiden Seitenkanälen, die Proben von Reservoir 1 in Richtung Reservoir 3 transportiert. Um eine repräsentative Zusammensetzung der Probe im Injektionsbereich zwischen den beiden Schnittpunkten zu gewährleisten, mußten die unterschiedlichen Migrationsgeschwindigkeiten der einzelnen Probenkomponenten berücksichtigt werden. Beim elektrokinetischen Injektionsmodus erreichen Substanzen mit großer Migrationsgeschwindigkeit das *doppel-T* vor langsamer wandernden Probenbestandteilen. Über eine entsprechend lang gewählte Injektionszeit, in der auch der Analyt mit der

kleinsten Wanderungsgeschwindigkeit den Schnittpunkt erreicht hatte, wurde gewährleistet, daß die Zusammensetzung der Probe in diesem Bereich der der Originalprobe entsprach. Durch einen Wechsel der angelegten Spannung von den Seitenkanälen zum Hauptkanal (Reservoir 2 und 5) wurde das sich zwischen den beiden Schnittpunkten befindende Probensegment in Richtung Reservoir 5 transportiert und es kam zur elektrophoretischen Separation der Probenbestandteile.

2.2.10.4 Detektion

Zu der am häufigsten *on-Chip* eingesetzten Detektionsmethode zählt die Laser-induzierte Fluoreszenz (LIF). Der Laserstrahl wurde, wie in Abbildung 16 schematisch dargestellt, zunächst über eine Linse fokussiert und anschließend über einen Spiegel als etwa 40 µm großer Spot auf den Trennkanal gelenkt. Die an diesem Punkt von der Probe emittierte Fluoreszenz wurde über ein Mikroskop-Objektiv gesammelt, durch eine Lochblende (800 µm) und optischen Bandpaßfilter (530 nm) auf einen Photomultiplier (PMT) gerichtet. Die Datenaufnahme erfolgte mit einer Frequenz von 50 Hz.

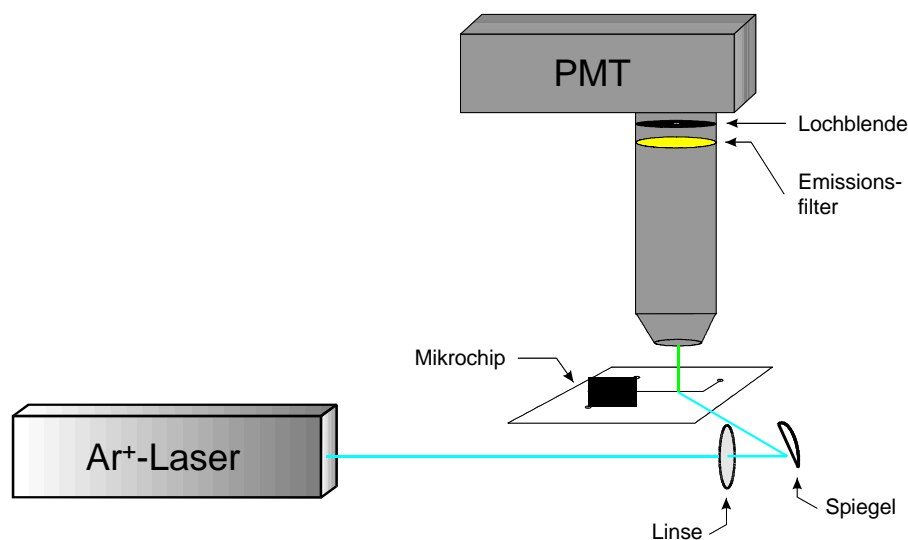


Abb. 16: Schematischer Aufbau zur LIF-Detektion auf einem Mikrochip

2.2.10.5 Trennung von Xanthin

Chip-Konfiguration und Spannungsprogramme

Zu Beginn jedes Meßtages wurde der Chip zunächst jeweils 10 min mit 1 M NaOH, H₂O dest. und CE-Puffer durch Anlegen eines Wasserstrahlvakuum konditioniert. In Tabelle 6 sind die Chip-Konfiguration und die zur Injektion bzw. Separation verwendeten Spannungsprogramme zusammengefaßt:

Reservoir	Lösung	Potential-Injektion	Potential-Separation
1	Probe	Masse	-0,2 kV
2	CE-Puffer	kein Potential	Masse
3	CE-Puffer	- 0,5 kV	-0,5 kV
4	CE-Puffer	kein Potential	kein Potential
5	CE-Puffer	kein Potential	-5 bis -7 kV

Tab. 6: Chip-Konfiguration und Spannungsprogramme

Während der elektrophoretischen Trennung im Hauptkanal wurden an die Reservoirs 1 und 3 geringe negative Potentiale angelegt, um somit einen sogenannten *pushback-Effekt* zu erzwingen. Dieser verhinderte, daß die Probe auch nach erfolgter Injektion noch in die Trennkapillare diffundieren konnte. Durch dieses Spannungsprogramm wurde die Probe durch den Puffer aus dem Hauptkanal in die Seitenarme zurückgedrückt.

Detektion

Xanthin wurde in Anschluß an die elektrophoretische Trennung mittels indirekter LIF detektiert. Zur Erzeugung eines Grundsignals wurde dem CE-Puffer daher Fluorescein zugesetzt. Die Xanthin-Standards wurden hingegen lediglich in CE-Puffer ohne die Zugabe des Fluorophors gelöst. Der Laserstrahl wurde auf einen Punkt fokussiert, der in Fließrichtung unmittelbar vor der ersten Krümmung im Hauptkanal lag. Gleichzeitig wurde der Mikrochip über einen XY-Translationstisch so unter dem Mikroskop-Objektiv positioniert, daß sich diese Kurve gerade noch im Sichtfeld befand.

2.2.10.6 Enzymassay

Für den enzymatischen Nachweis von Xanthin wurde ein Bi-Enzym-System in Verbindung mit einer Detektion über Chemilumineszenz (CL) gewählt:



Das durch die Konvertierung von Xanthin durch die Xanthin-Oxidase produzierte H_2O_2 wurde in einer nachfolgenden Peroxidase-katalysierten Reaktion mit Luminol in einem basischen Medium zu 3-Aminophthalat umgesetzt. Als weiteres Produkt wurde hierbei ein Photon mit einer Wellenlänge von 425 nm emittiert. Da bei dieser Detektionsmethode auf eine externe Lichtquelle verzichtet werden konnte, reduzierte sich das in Abbildung 16 dargestellte optische System auf das Mikroskop-Objektiv, über das die Chemilumineszenz gesammelt und, ohne zuvor eine Lochblende oder einen Bandpaßfilter passiert zu haben, an einen mit höchster Empfindlichkeit (+ 900 V) arbeitenden Photomultiplier weitergeleitet wurde.

2.2.10.7 Kontinuierliches Mikrofließsystem

Die Untersuchungen zur enzymatischen Xanthin-Bestimmung in einem Mikrofließsystem wurden in dem bereits schon beschriebenen POCRE-1-Chip durchgeführt. In diesem Fall wurde das Kapillarnetzwerk nicht zur Injektion und Separation der Probe genutzt, sondern als kontinuierliches Fließsystem betrieben. Mit der in Tabelle 7 angegebenen Konfiguration und dem Spannungsprogramm wurden die in den Reservoirs 1-4 befindlichen Lösungen kontinuierlich in Richtung Reservoir 5 transportiert; dabei dienten die drei Schnittpunkte der Seitenkanäle 1, 3 und 4 mit dem Hauptkanal als Mischstücke, an denen jeweils Reagenzien, die für die Gesamtreaktion von Bedeutung waren, zugegeben wurden. Die beteiligten Enzyme, XOD und POD, wurden sowohl in Lösung als auch in immobilisierter Form eingesetzt, indem sie - wie unter 2.2.3.1 beschrieben - kovalent auf Nucleosil-Beads gebunden wurden.

Reservoir	Lösung	Potential
1	Peroxidase	Masse
2	Luminol	Masse
3	Borat-Puffer pH 9	Masse
4	H ₂ O ₂ bzw. XOD/Xanthin-Gemisch	Masse
5	Borat-Puffer pH 9	- 5 kV

Tab. 7: Konfiguration des POCRE-1-Chips und Spannungsprogramm für CL-Detektion

Der Detektor wurde bei dieser Versuchsreihe in Fließrichtung hinter dem Y-Schnittpunkt platziert.

2.2.10.8 Mikrofließsystem mit integriertem Enzymreaktor

Der in Abbildung 17A gezeigte RCC-Chip (Reaction Chamber for Cells) enthielt zusätzlich zu den Kapillaren eine in das mikrofluide System integrierte Kammer mit einem Volumen von etwa 330 pl (Abb. 17B).

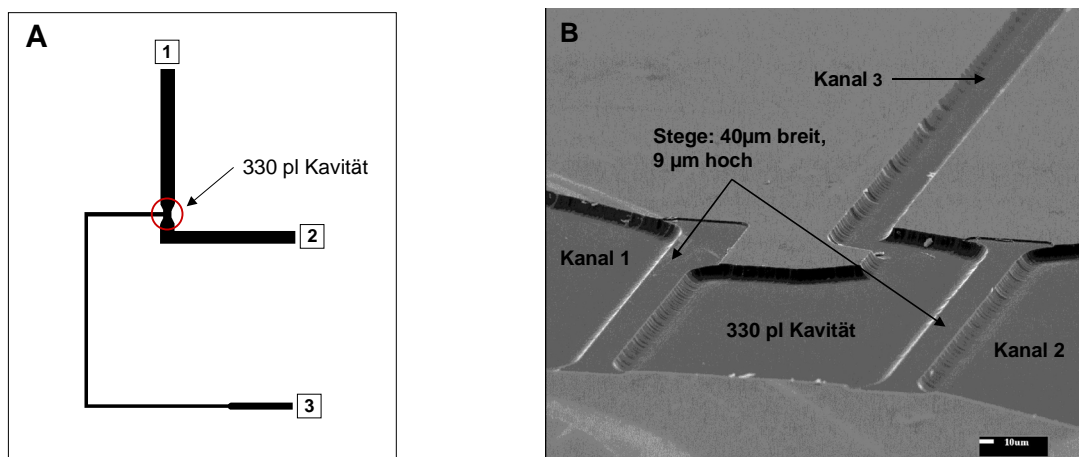


Abb. 17: A: Layout des RCC-Chips; B: SEM-Aufnahme des integrierten Reaktors (Oleschuk et al., 2000)

Zur Erzeugung des Reaktors in einem breiten Fließkanal waren im Gegensatz zur Fabrikation des POCRE-1-Chips zwei Photomasken notwendig. Mit Hilfe der ersten Maske wurde das gesamte Fließsystem mit Ausnahme von zwei 40 µm breiten Stegen auf eine Tiefe von 10 µm geätzt (Abb. 17B). Die zweite Maske diente

lediglich dazu, die Höhe dieser Stege um 1 μm zu reduzieren, so daß sie nur noch 9 μm aus dem Kanalsystem herausragten. Auf diese Weise entstanden nach dem Bonden ein 1 μm breiter Spalt zwischen den Stegen und dem Cover-Chip, über den der Flüssigkeitstransport gewährleistet blieb. Das Segment zwischen den Wällen bildete den Reaktor, der über einen schmalen Kanal elektrokinetisch mit Enzymbeads gefüllt werden konnte. Da das verwendete Trägermaterial im Durchschnitt einen Durchmesser vom 5 μm besaß, wurde es durch den nur 1 μm breiten Spalt im Reaktor gehalten und am Ausspülen in den Fließkanal gehindert. Die übrigen Dimensionen des RCC-Chips sind in Tabelle 8 zusammengefaßt:

Kanal	Tiefe [μm]	Länge [mm]	Breite [μm]
1	10	6,5	580
2	10	6,5	580
3	10	14,93	30

Tab. 8: Dimensionen des RCC-Chips

In Tabelle 9 sind die zur Beladung des Reaktors und zur Ausführung des enzymatischen Assays verwendeten Chip-Konfigurationen sowie die entsprechenden Spannungsprogramme wiedergegeben.

Reservoir	Reaktor-Beladung		Assay	
	Lösung	Potential	Lösung	Potential
1	Borat-Puffer	Masse	Borat-Puffer	- 0,4 kV
2	Borat-Puffer	Masse	H ₂ O ₂ bzw. Xanthin	Masse
3	Beadsuspension	+ 0,8 kV	Luminol	Masse

Tab. 9: Konfiguration und Spannungsprofil zur Reaktorbeladung und zur Durchführung des CL-Assay im RCC-Chip

Die Detektorposition wurde so über Kanal 1 gewählt, daß der den Reaktor begrenzende Steg gerade noch im Sichtfeld des Mikroskops lag.

3. Ergebnisse

3.1 Amperometrische Bestimmung von ATP

Zur Bestimmung von ATP wurde das bereits unter 1.5.1.1 vorgestellte Enzympaar Glucose-Oxidase/Hexokinase gewählt, da zum einen über dieses System eine amperometrische Detektion ermöglicht wurde und der resultierende Sensor so mit weiteren zur Bioprozeßkontrolle relevanten Enzymsensoren in ein Mehrkanal-Fließinjektionssystem integriert werden konnte. Zum anderen erforderte diese ATP-Bestimmungsmethode weder die Kopplung einer dritten enzymatischen Reaktion noch wurde der Zusatz von Coenzymen nötig. Aus diesem Grund erwies sich dieser Nachweis letztendlich gegenüber den beiden anderen in Kap. 1.5.1.1 beschriebenen Verfahren als geeigneter, da sich sowohl der Kosten- als auch der Zeitaufwand zur Optimierung der für beide Enzyme günstigsten Assaybedingungen deutlich reduzierte.

Für die amperometrische ATP-Bestimmung wurden beide Enzyme auf einer Platin-Dickschichtelektrode über Glutardialdehyd co-immobilisiert. Durch die Glucose-oxidation, die von der GOD katalysierte Reaktion, entstand H_2O_2 , das an der Elektrodenoberfläche detektiert wurde. Bei Anwesenheit von ATP in der Probe, wurde die Glucose teilweise in der Hexokinase-Reaktion umgesetzt und die Menge des produzierten Wasserstoffperoxids somit herabgesetzt.

3.1.1 Einfluß der Magnesiumionen-Konzentration

Der enzymatische Mechanismus der Hexokinase-Reaktion erfordert als Co-substrat neben dem ATP zusätzlich Magnesium (Colowick, 1973):



Daher wurde zunächst an einer silanisierten Platin-Dickschichtelektrode untersucht, welchen Einfluß der Zusatz von MgCl_2 zum Carrier-Puffer auf das reine elektrochemische H_2O_2 -Signal ausübte. Hierzu wurde die Elektrode als Detektor in das im Ein-Kanal-Modus betriebene FIA-System (Abb. 9) integriert, eine 1 mM H_2O_2 -Lösung injiziert und die resultierende Stromdichte bei verschiedenen Magnesium-

salz-Konzentrationen im Trägerstrom aufgezeichnet. Für diese Untersuchung wurden zwei Carrier, 50 mM Clark & Lubs pH 8 und 0,1 M KPP pH 8, verwendet, in denen sich der Zusatz von MgCl_2 unterschiedlich stark auf die H_2O_2 -Oxidation auswirkte (Abb.18).

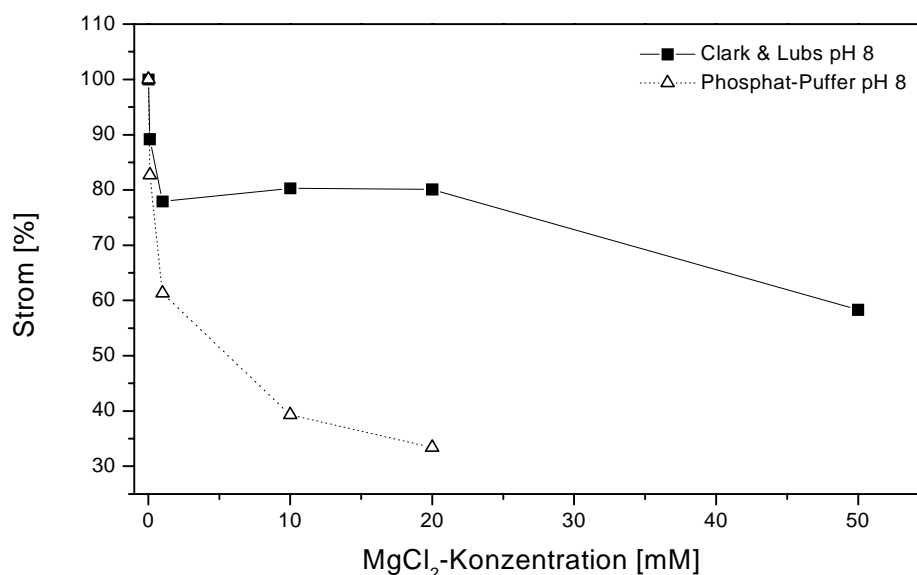


Abb. 18: Einfluß der MgCl_2 -Konzentration auf die elektrochemische H_2O_2 -Oxidation; Injektion von 1 mM H_2O_2 -Standard, silanisierte Pt-Dickschichtelektrode

Mit dem Phosphat-Puffer wurde eine exponentielle Abnahme des amperometrischen Signals mit zunehmender Salzkonzentration beobachtet. Bereits eine zugesetzte Menge von 100 μM führte zu einer 17%igen Reduzierung der Stromdichte, wurde die MgCl_2 -Konzentration auf bis zu 20 mM erhöht, sank das Signal auf 33,4% seiner ursprünglichen Höhe ab. Ein anderes Verhalten wurde bei Verwendung von Clark & Lubs-Puffer als Trägerstrom erhalten. Die Stromdichte sank zunächst auch um etwa 10% bzw. 22% bei der Zugabe von 100 μM bzw. 1 mM Mg^{2+} ab, stabilisierte sich dann jedoch um diesen Wert bis zu einer Konzentration von 20 mM, bei einer weiteren Erhöhung auf 50 mM verringerte sich das Signal auf 58,3%. Die allgemein mit beiden Puffern beobachtete Abnahme der Stromdichte war nicht in einer Elektrodenreaktion des Salzes begründet, da Injektionen einer reinen MgCl_2 -Lösung kein Signal erzeugten. Vielmehr war die Ursache in einer Ablagerung der Mg^{2+} -Ionen auf der Elektrodenoberfläche zu sehen, die zu einer Deaktivierung und damit zu einer Reduzierung der resultierenden Stromhöhen führte. Aufgrund der Komplexierung der Magnesiumionen durch Borat, blieb die Sensoroberfläche bei Ver-

wendung von C&L-Puffer im Vergleich zum KPP-Puffer aktiver, so daß größere Ströme registriert wurden.

Alle nachfolgenden Untersuchungen zur amperometrischen ATP-Bestimmung mit Hilfe des Glucose-Oxidase/Hexokinase-Systems wurden mit 50 mM Clark & Lubs/10 mM MgCl_2 pH 8 als Carrier-Puffer durchgeführt. Die Salzkonzentration von 10 mM wurde dabei aus zwei Gründen gewählt: erstens blieb so gewährleistet, daß das Elektrodensignal nicht durch kleine Ungenauigkeiten bei der eingewogenen Mg^{2+} -Menge beeinträchtigt wurde und zweitens hat sich diese Konzentration des Co-substrats auch als optimal für die enzymatische ATP-Umsetzung durch die Hexokinase erwiesen (Compagnone und Guilbault, 1997).

3.1.2 Verhältnis der immobilisierten Enzymmengen

Enzymsensoren zur amperometrischen ATP-Bestimmung wurden durch Co-Immobilisierung der beiden beteiligten Enzyme über Glutardialdehyd auf einer Platin-Einzelelektrode hergestellt. Zur Optimierung des Verhältnisses mit dem die Hexokinase und Glucose-Oxidase immobilisiert werden mußten, um einen möglichst sensitiven ATP-Biosensor zu erhalten, wurden 7 μl HK mit einer Gesamtaktivität von 16 Units mit jeweils 1,5 μl verschieden konzentrierter GOD-Lösungen verrührt und wie unter 2.2.3.1 beschrieben auf die Oberfläche einer silanisierten Pt-Elektrode gebunden. In Tabelle 10 sind die eingesetzten GOD-Aktivitäten sowie die daraus resultierenden theoretischen Aktivitätsverhältnisse in der Enzymmembran der einzelnen Sensoren zusammengefaßt.

Elektroden-Nr.	Aktivität der GOD-Lösung	Aktivitäts-Verhältnis HK/GOD
1	0,45 Units	35,6
2	0,9 Units	17,8
3	2,25 Units	7,1
4	9 Units	1,78
5	45 Units	0,36

Tab. 10: Aktivitätsverhältnis der co-immobilisierten Hexokinase und Glucose-Oxidase

Die Elektroden 1 bis 5 wurden anschließend als Detektoren in das Fließsystem integriert. Zur Erzeugung des Grundsignals durch die GOD-Reaktion wurde dem Carrier neben Magnesiumchlorid noch 50 μM Glucose zugesetzt. Um eine Signaländerung zu vermeiden, die lediglich aus einer Verdünnung der Glucose- oder Mg^{2+} -Konzentration im Trägerstrom durch die Injektion einer in reinem Puffer angesetzten Probe resultierte, wurden alle ATP-Standards ebenfalls in Clark & Lubs unter Zusatz dieser beiden Substanzen gelöst. Die Messungen wurden vorgenommen, indem vor jeder ATP-Probe zur Bestimmung der Grundlinie jeweils der Carrier injiziert wurde. In Abbildung 19a sind die auf die Anwesenheit von ATP zurückzuführenden Signalabnahmen dargestellt, Abbildung 19b zeigt zur besseren Übersicht nochmals die mit den verschiedenen Elektroden erhaltenen Signalverläufe in einem ATP-Konzentrationsbereich von 0 bis 62,5 μM .

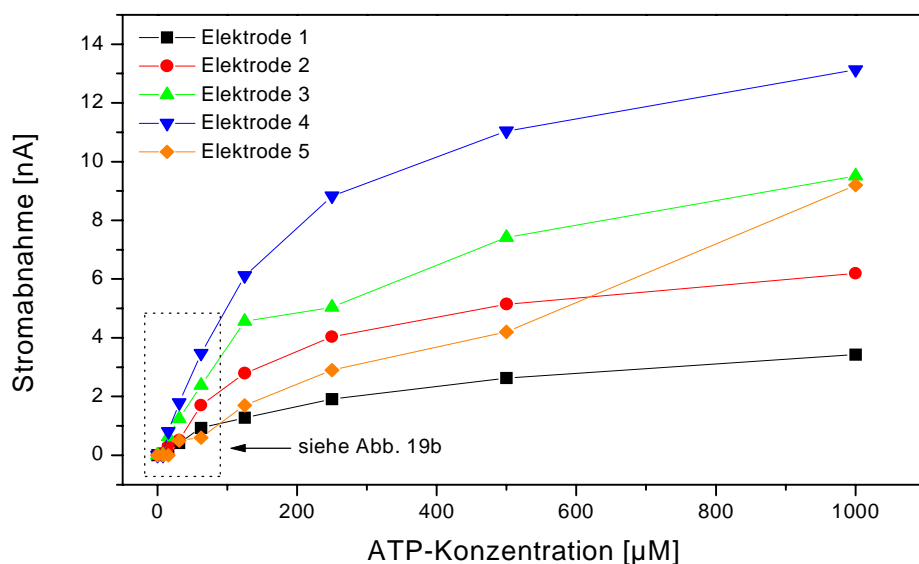


Abb. 19a: Einfluß des HK/GOD-Aktivitätsverhältnisses auf das amperometrische ATP-Signal

Bei einer konstanten Glucose-Konzentration von 50 μM wurden die größten Stromabnahmen bei Injektion einer ATP-haltigen Probe mit einem HK/GOD-Aktivitätsverhältnis von 1,78 (Elektrode 4) erreicht. Wurde das Verhältnis weiter zu Ungunsten der GOD verschoben, verkleinerte sich die Differenz zwischen dem Grund- und ATP-Signal mit abnehmender immobilisierter GOD-Aktivität. Zurückzuführen war dieser Effekt auf eine Substratsättigung der GOD. Die im Carrier vorliegende Glucose-Konzentration blieb auch in Gegenwart von ATP ausreichend groß, um eine geringe

Menge immobilisierter GOD zu sättigen, daher hatte der Glucose-Entzug durch die Hexokinase-Reaktion weniger Einfluß auf das Grundsignal.

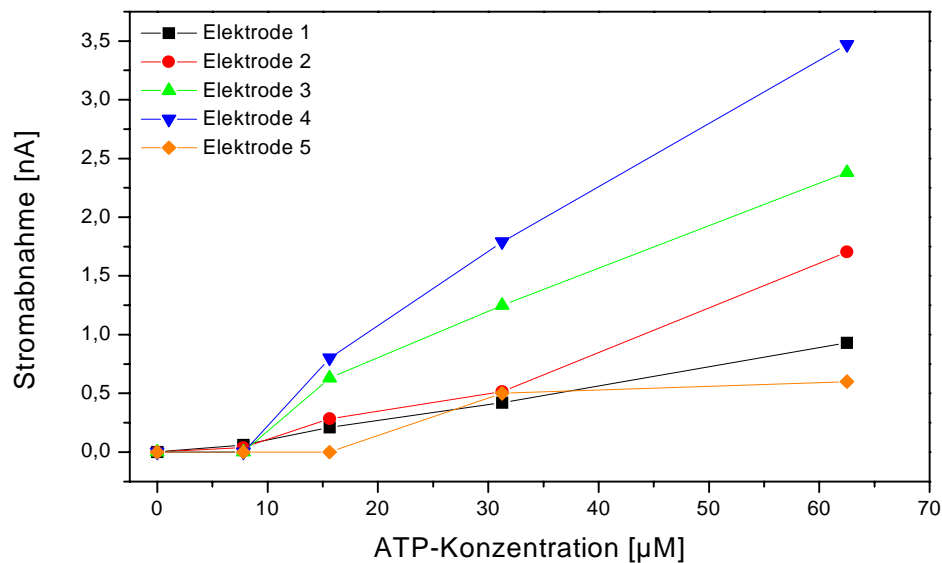


Abb 19b: Einfluß des HK/GOD-Aktivitätsverhältnisses beim Nachweis geringer ATP-Konzentrationen

Elektrode 5, die mit der größten GOD-Aktivität immobilisiert wurde, zeigte im Vergleich zu allen anderen Sensoren einen abweichenden Kurvenverlauf. Aufgrund des GOD-Überschusses wurde ein sehr hohes Grundsignal erzeugt, das durch die Injektion von schwach konzentrierten ATP-Proben (7,8/15,63 µM) keine Beeinflussung erfuhr. Erst bei einer ATP-Konzentration von 31,25 µM wurde der GOD-Reaktion genug Glucose entzogen, um das amperometrische H₂O₂-Signal zu verringern und wies bei der Messung der weiteren ATP-Standards im Gegensatz zu den Elektroden 1 bis 4 keinen hyperbolischen sondern einen linearen Verlauf auf.

Die linearen Bereiche, Sensitivitäten und berechneten Nachweisgrenzen (S/N=3) für die einzelnen Biosensoren sind in Tabelle 11 zusammengefaßt.

Elektrode	linearer Meßbereich	Sensitivität	Detektionslimit
1	0 µM bis 62,5 µM	0,015 nA/µM	11,8 µM
2	0 µM - 62,5 µM	0,028 nA/µM	11,1 µM
3	7,8 µM – 125 µM	0,037 nA/µM	9 µM
4	7,8 µM – 125 µM	0,051 nA/µM	8,1 µM
5	12,1 µM – 1000 µM	0,009 nA/µM	28,6 µM

Tab. 11: Lineare Meßbereiche, Sensitivitäten und Nachweisgrenzen der entwickelten ATP-Sensoren

Im allgemeinen vergrößerte sich der lineare Meßbereich mit zunehmender GOD-Aktivität in der Membran, was auf die größere immobilisierte Enzymmenge und eine damit verbundene Verschiebung des Substratsättigungsbereiches zu höheren Glucose-Konzentrationen zurückzuführen war. Jedoch wurde mit ansteigender GOD-Aktivität auch die untere Grenze des linearen Meßbereiches aus den bereits zuvor diskutierten Gründen zu höheren ATP-Konzentrationen verschoben. Durch die Injektion der ATP-Standards wurde daher für Elektrode 5 eine lineare Signalabnahme von 12,1 bis 1000 μM ATP ermittelt. Als nachteilig wirkte sich die große GOD-Aktivität jedoch auf die Sensitivität und das Detektionslimit dieser Enzymelektrode aus. Durch den hohen Glucose-Umsatz durch die GOD-Reaktion betrug die Empfindlichkeit des entwickelten Detektionssystems für ATP nur 9 $\text{pA}/\mu\text{M}$ und wies eine Nachweisgrenze von 28,6 μM auf, die damit im Vergleich zu Elektrode 4 mit einem optimalen HK/GOD-Verhältnis um einen Faktor von 3,5 höher lag. Im linearen Bereich, der von 7,8 bis 125 μM ATP reichte, besaß dieser Biosensor unter den gewählten Bedingungen eine Nachweisgrenze von 8,1 μM ATP.

3.1.3 Glucose-Konzentration

Nach der Optimierung des Enzymverhältnisses ($\text{HK}/\text{GOD} \approx 1,8$) wurde weiter untersucht, welchen Einfluß die dem Carrier zugesetzte Glucose-Menge auf das Detektionslimit und die Sensitivität bei der ATP-Bestimmung ausübte.

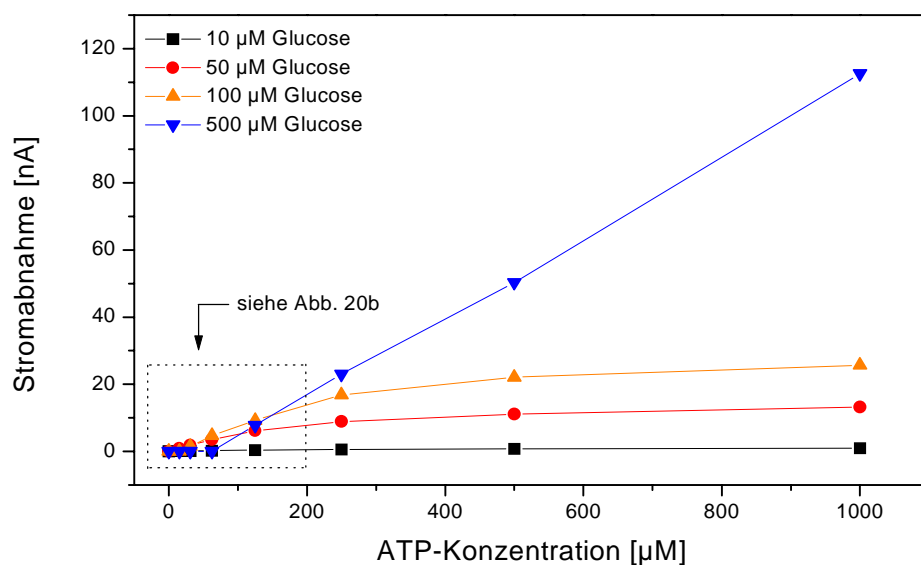


Abb. 20a: Einfluß der Glucose-Konzentration auf die Signalabnahme

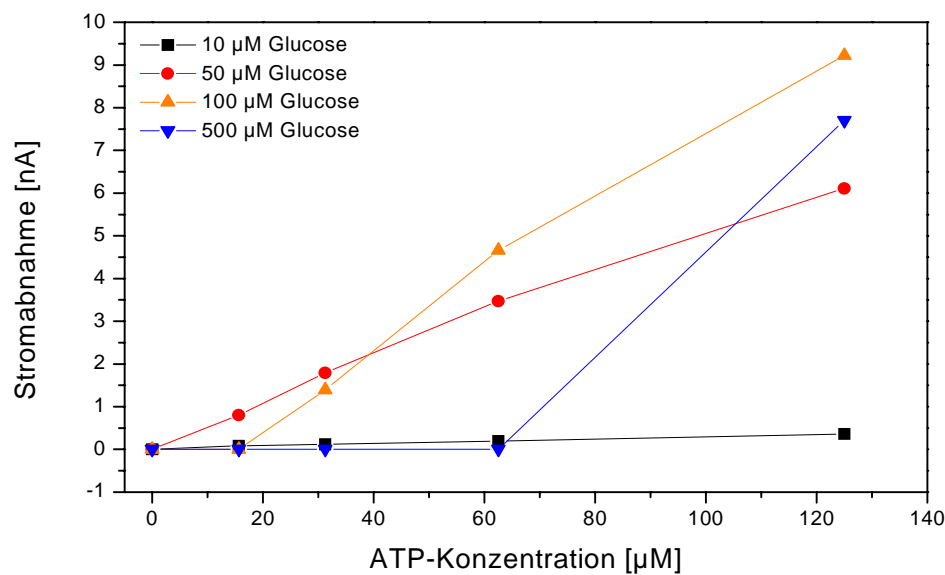


Abb. 20b: Einfluß der Glucosemenge auf das ATP-Signal im Konz.-Bereich von 0 – 125 μM ATP

Neben einer Glucose-Konzentration von 50 μM wurden Messungen mit einem Zusatz von 10 μM , 100 μM und 500 μM des Kohlenhydrats zum Clark & Lubs-Puffer durchgeführt. Bei der Herstellung der ATP-Standards wurden diese Konzentrationen jeweils mit berücksichtigt. Mit dem Anheben der Glucose-Konzentration standen der Hexokinase und Glucose-Oxidase größere Substratmengen zur Verfügung, so daß beide Reaktionen mit einem erhöhten Umsatz abliefen und zu einer mit der Glucose-Konzentration ansteigenden Differenz zwischen Grund- und ATP-Signal führten (Abb. 20a/b). Aus Abbildung 21 wird deutlich, daß das Grundsignal des entwickelten Biosensors linear auf die dem Carrier zugesetzten Glucose-Konzentrationen reagierte. Bei Einsatz der verschiedenen Glucose-Carrier-Konzentrationen veränderte sich der lineare Meßbereich, die Sensitivität und das berechnete Detektionslimit der Bi-Enzymelektrode wie in Tabelle 12 angegeben:

Glucose-Konz.	linearer Meßbereich	Sensitivität	Detektionslimit
10 μM	0 – 125 mM	2,7 pA/ μM	nb
50 μM	0 – 125 μM	51 pA/ μM	8,1 μM
100 μM	15,5 – 250 μM	70 pA/ μM	18,3 μM
500 μM	62,5 – 1000 μM	115 pA/ μM	65,4 μM

Tab. 12: Einfluß der Glucose-Carrier-Konzentration auf den linearen Meßbereich, die Sensitivität und Nachweisgrenze der HK/GOD-Elektrode 4

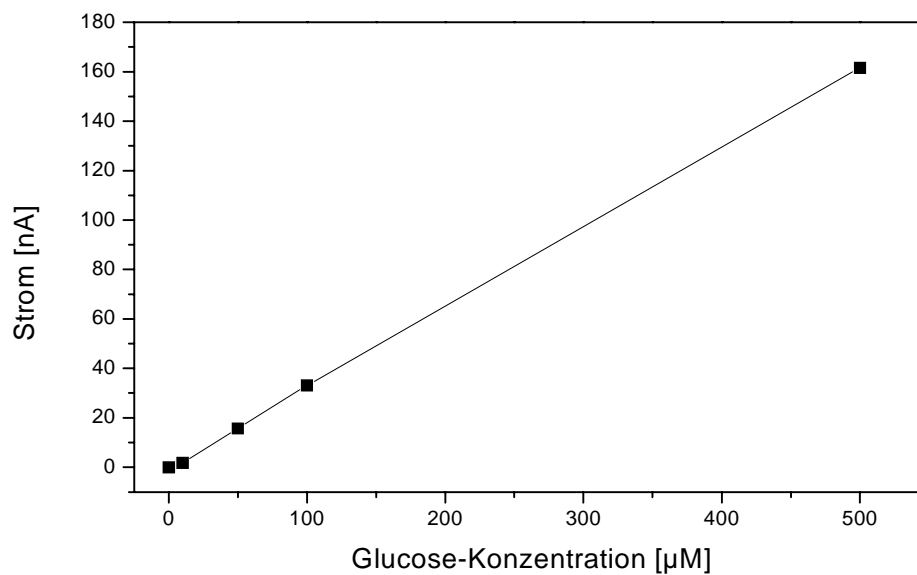


Abb. 21: Einfluß der Glucose-Konzentration auf die Höhe des Grundsignals, Elektrode 4

Aus Tab. 12 geht hervor, daß sich zur ATP-Bestimmung ein Glucose-Zusatz von 50 μM am besten eignete, da sich unter diesen Bedingungen ein optimales Verhältnis zwischen der Größe des linearen Meßbereiches, der Elektroden-Empfindlichkeit und der Nachweisgrenze einstellte. Im Unterschied zu Tab. 11 erstreckte sich der lineare Bereich bei dem hier eingesetzten Sensor von 0 bis 125 μM ATP, was auf geringe Ungenauigkeiten bei der Sensorherstellung zurückzuführen war, die durch das manuelle Aufpipettieren der Enzymlösung bedingt waren.

Mit einer Glucose-Konzentration von 500 μM wurden zwar die im Rahmen dieser Untersuchungsreihe maximalen Werte für die Größe des linearen Bereiches und die Detektorsensitivität ermittelt, jedoch erhöhte sich die Nachweisgrenze unter diesen Bedingungen um den Faktor 8, so daß sich die größere Kohlenhydrat-Konzentration zusammenfassend betrachtet ungünstig auf die Sensoreigenschaften auswirkte. Aufgrund der sehr geringen Empfindlichkeit (2,7 $\text{pA}/\mu\text{M}$) bei einer Glucose-Zugabe von nur 10 μM führte eine rechnerische Bestimmung des Detektionslimits mit Hilfe des Dreifachen des Grundlinienrauschens zu keinem auswertbarem Ergebnis.

3.1.4 Veränderung der Sensoreigenschaften nach Lagerung

Nach der Optimierung der Glucose-Konzentration wurde Elektrode 4 über Nacht bei RT in der Fließzelle bei weiterhin angelegtem Potential in reinem Clark & Lubs-

Puffer ohne Zusätze gelagert. Die anschließend mit einer Puffer-Glucose-Konzentration von 50 μM aufgenommene Kalibrierkurve ist in Abbildung 22 dargestellt.

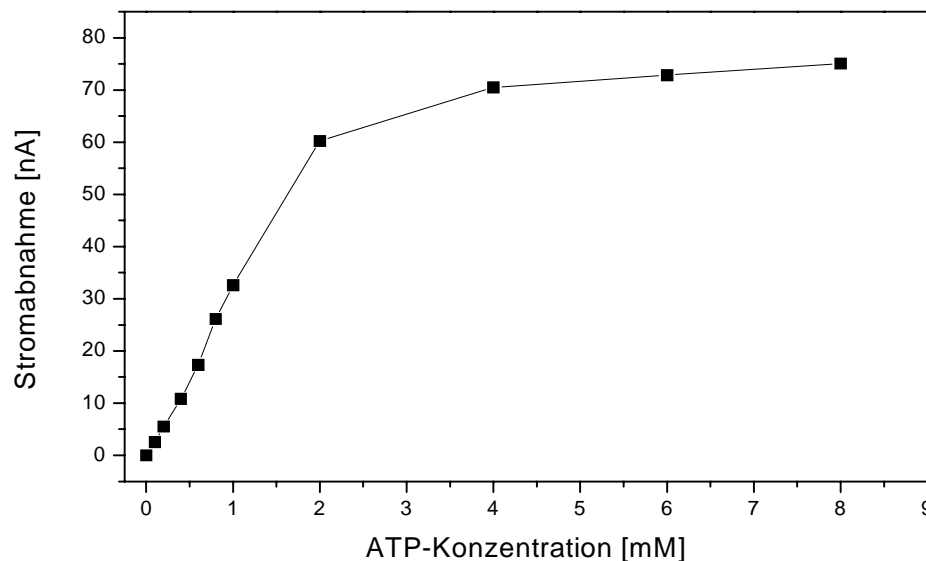


Abb. 22: ATP-Kalibrierkurve nach Lagerung von Elektrode 4, Clark & Lubs pH 8, 10 mM MgCl_2 , 50 μM Glucose

Nach der Lagerung verringerte sich die Empfindlichkeit des Biosensors um 39,2% auf 31 $\text{pA}/\mu\text{M}$, jedoch erweiterte sich der lineare Meßbereich um den Faktor 16 (0 bis 2 mM ATP). Dieser Effekt war auf eine stärkere Deaktivierung der immobilisierten Hexokinase während der Lagerungsphase zurückzuführen, so daß sich das Aktivitätsverhältnis weiter zu Gunsten der Glucose-Oxidase verschob, die als stabileres Enzym hiervon weniger beeinflusst wurde. Wie bereits unter 3.1.2. beschrieben erweiterte sich mit einer Verschiebung des Aktivitätsverhältnisses zu Gunsten der GOD der lineare Meßbereich, wodurch gleichzeitig jedoch die Sensitivität des Detektionssystems herabgesetzt wurde. Dieses Phänomen wurde in diesem Fall durch die Alterung der Elektrode hervorgerufen. Allerdings führte eine weitere Lagerung der Elektrode über Nacht dazu, daß sie in ihrer Funktionalität fast vollständig eingeschränkt wurde. Die entwickelten Biosensoren konnten somit über einen Zeitraum von etwa 48 Stunden zur ATP-Bestimmung genutzt werden.

3.1.5 Bi-Enzymreaktoren

Um einen Biosensor mit möglichst höherer Empfindlichkeit als mit den verschiedenen Enzymelektroden ermittelt zu erhalten, wurden die Enzyme über

Glutardialdehyd auf APTS-silanisiertes CPG co-immobilisiert. Über die dadurch zur Verfügung stehende größere Oberfläche sollte sich im allgemeinen mehr Enzym binden und damit ein im Vergleich höherer absoluter enzymatischer Umsatz erzielen lassen. Die aktivierten Glas-Beads wurden mit einem Gesamtvolumen von 3 ml Enzymlösung, in der Hexokinase und Glucose-Oxidase im Aktivitätsverhältnis von 2:1 vorlagen, immobilisiert. Das Immobilisat wurde im Anschluß mit Hilfe einer peristaltischen Pumpe in eine Kartusche (ID: 6 mm ; 0,14 ml Volumen \approx 56 mg CPG) gefüllt und über einen Reaktorhalter in das Fließsystem integriert; die H_2O_2 -Detektion fand an einer silanisierten Platin-Dickschichtelektrode statt. Zunächst wurde auch hier die Abhängigkeit des ATP-Signals von der Glucosevorlage im Carrier untersucht (Abb. 23).

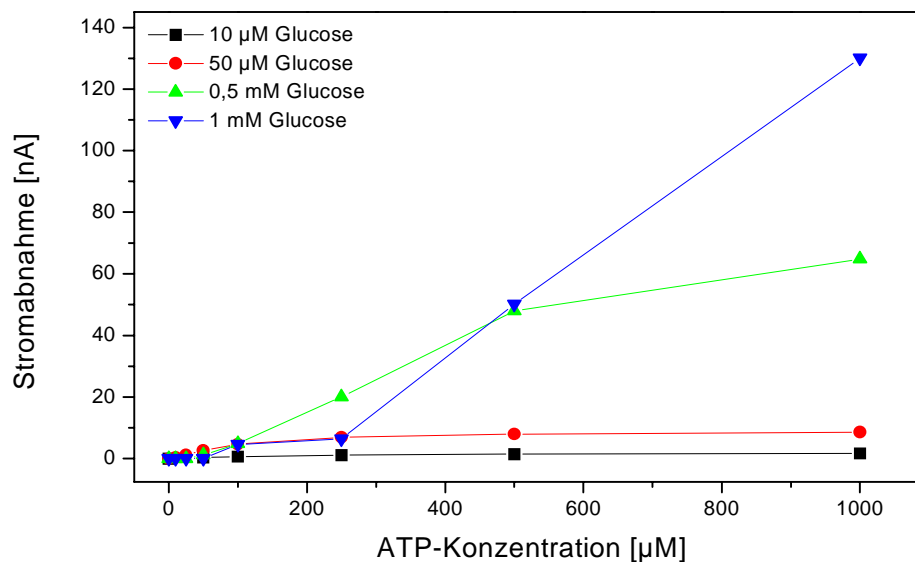


Abb. 23: Einfluß der Glucose-Carrier-Konzentration auf das ATP-Signal bei Verwendung eines HK/GOD-Reaktors

Auch unter Verwendung eines Bi-Enzymreaktors zeigte das amperometrische Signal die bereits bei den Enzymelektroden beobachtete Abhängigkeit von der Glucose-Konzentration. Ein Vergleich mit den Tabelle 13 angegebenen Eigenschaften der Enzymelektroden macht deutlich, daß sich der Reaktor bei den beiden geringsten Glucose-Konzentrationen sehr ähnlich wie die Elektrode verhielt, erhöhte man die Kohlenhydratmenge jedoch, wurden für den Reaktor kleinere lineare Meßbereiche sowie geringere ATP-Sensitivitäten bestimmt, woraus die Berechnung höherer Nachweisgrenzen resultierte.

Glucose-Konz.	linearer Meßbereich	Sensitivität	Detektionslimit
10 μM	0 – 100 μM	6,7 pA/ μM	20,7 μM
50 μM	0 – 100 μM	48 pA/ μM	13,9 μM
0,5 mM	50 – 500 μM	98 pA/ μM	52,1 μM
1 mM	100 – 1000 μM	129 pA/ μM	119 μM

Tab. 13: Einfluß der Glucose-Konzentration auf die ATP-Bestimmung über einen HK/GOD-Reaktor

Für Glucose wurde eine lineare Abhängigkeit des Signals von der Konzentration (0 – 1 mM) erhalten. Trotz der größeren Oberfläche wurde über den Reaktor mit 164 nA/mM eine Glucose-Sensitivität erreicht, die nur 50% der HK/GOD-Elektroden-Empfindlichkeit (324 nA/mM) entsprach. Diese herabgesetzte Glucose-Sensitivität bei Immobilisierung auf poröse Glasträger war wahrscheinlich auf die Anwesenheit der Hexokinase zurückzuführen, die als zweites Enzym um Bindungsstellen auf der Oberfläche konkurrierte. Bei der Hexokinase handelt es sich um ein bei neutralem pH-Wert als Homodimer vorliegendes Enzym (Behlke *et al.*, 1998) mit einer molekularen Masse von 104 kDa (Colowick, 1973; Kopetzki *et al.*, 1985), das mit ansteigendem pH oder durch Anheben der Ionenstärke in identische Monomere dissoziiert. In der Literatur werden sowohl das Dimer (Shill *et al.*, 1974) als auch die Monomere (Furman und Neet, 1983) als katalytisch aktiv beschrieben. Glucose-Oxidase liegt ebenfalls als Homodimer vor, ist jedoch mit einer Molekülmasse von 130 bis 320 kDa, in Abhängigkeit vom Glycosylierungsgrad (Kohen *et al.*, 1997), größer als die HK. Die geringe Glucose-Sensitivität des Bi-Enzymreaktors begründete sich möglicherweise genau auf diesen Größenunterschied, denn die Hexokinase konnte besonders bei Dissoziation in ihre beiden kleinen Untereinheiten wesentlich ungehinderter als die GOD auch in die Poren des CPGs eindringen und sich dort anlagern. Die Glucose-Oxidase wurde somit aufgrund von größeren sterischen Hinderungen und Kompetition hauptsächlich außerhalb der Poren an die Glasoberfläche gebunden. Dadurch reduzierte sich die immobilisierte GOD-Menge im Verhältnis zur Gesamtoberfläche, woraus wiederum die geringe Glucose-Sensitivität resultierte. Die durch die unterschiedliche Molekülgröße verursachte Verschiebung des eingesetzten HK/GOD-Verhältnisses von etwa 2:1 zu Gunsten der kleineren HK, wurde hierbei durch ihre geringere Stabilität ausgeglichen. Nach der Immobilisierung über Nacht stellte sich möglicherweise das ursprüngliche Verhältnis wieder ein, die absoluten Aktivitäten sanken jedoch aufgrund der geschilderten

Vorgänge trotz der größeren Oberfläche auf das *Elektrodeniveau* ab und führten so zu den vergleichbaren Ergebnissen. Wurde der Reaktor am Ende des ersten Meßtages eine weitere Nacht bei 4°C gelagert, konnte aufgrund einer Deaktivierung der Hexokinase kein ATP-Signal mehr detektiert werden.

3.1.6 HK-Reaktor/GOD-Elektrode

Als weitere Variante wurde neben der Co-Immobilisierung der beiden beteiligten Enzyme ihre getrennte Kopplung auf unterschiedlichen Trägermaterialien zur amperometrischen ATP-Bestimmung untersucht. Die Hexokinase wurde hierfür aufgrund ihrer geringeren Aktivität und Größe mittels der unter 2.2.3.1 beschriebenen Methode auf CPG gebunden, während die GOD (2 mg/ml) über Glutardialdehyd auf eine silanisierte Platin-Dickschichtelektrode immobilisiert wurde. Eine ATP-Kalibrierkurve, die mit diesem System aufgenommen wurde, ist in Abb. 24 gezeigt.

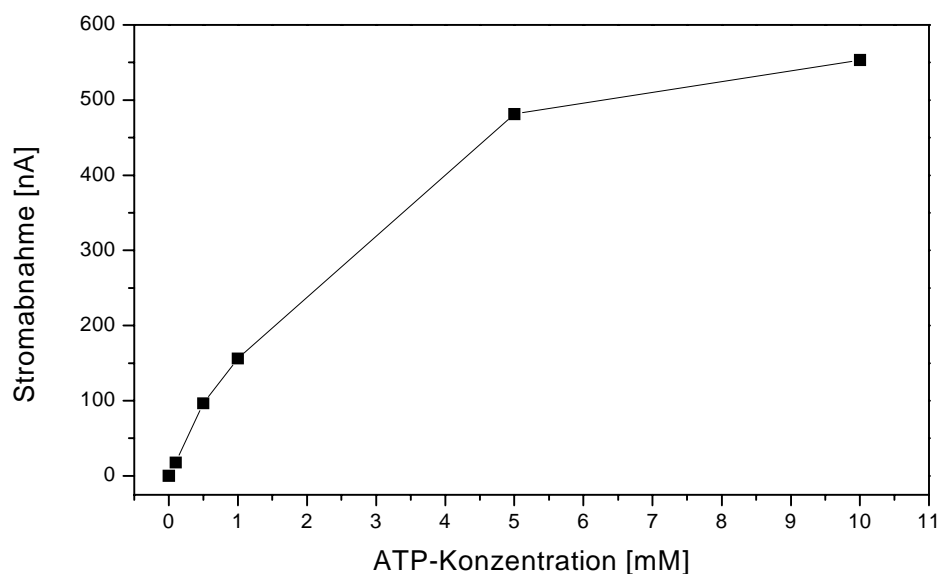


Abb. 24: ATP-Kalibrierkurve, HK-Reaktor, GOD-Elektrode, 10 µM Glucose

Die Tatsache, daß ausschließlich GOD mit einer Gesamtaktivität von 57 Units auf die Dickschichtelektrode immobilisiert wurde, führte zu einer erhöhten Glucose-Sensitivität gegenüber den Bi-Enzymsystemen, so daß dem Carrier neben 10 mM MgCl_2 zur Erzeugung einer ausreichend hohen und stabilen Grundlinie nur 10 µM des Kohlenhydrats zugesetzt wurden. Die Kalibrierkurve verlief zwischen 0 und 1 mM ATP linear und besaß eine Steigung von 158 nA/mM. Damit wurde mit 10 µM

Glucose durch die separate Immobilisierung der beiden Enzyme auf räumlich voneinander getrennte Träger eine erhebliche Sensitivitätssteigerung gegenüber der Bi-Enzymelektrode (6,7 nA/mM) erreicht. Die Glucose wurde zunächst im Reaktor allein durch die Hexokinase umgesetzt, durch die Abwesenheit der GOD und damit einem Ausbleiben der Konkurrenz beider Enzyme um das Substrat, konnte mehr Glucose auf diesem Weg zu Glucose-6-Phosphat phosphoryliert werden, worauf sich letztendlich die größere Empfindlichkeit gegenüber den co-immobilisierten Biosensoren begründete. Problematisch blieb jedoch weiterhin die geringe Stabilität der immobilisierten Hexokinase, die auch in diesem Fall nach einer Lagerung über Nacht bei 4°C so stark deaktiviert wurde, daß am darauffolgenden Tag keine ATP-Signale mehr detektiert werden konnten.

3.2. Amperometrische Bestimmung von Xanthin

3.2.1 XOD-Platin-Dickschichtelektroden

3.2.1.1 Untersuchung unspezifischer Signale

Da es sich bei Xanthin um eine Substanz handelte, die eine eigene elektrochemische Aktivität besaß und damit an der Elektrode direkt oxidiert werden konnte, wurde zunächst mit Hilfe der cyclischen Voltametrie (Kap. 2.2.4.2) der Einfluß des Potentials auf dieses enzym-unabhängige Signal untersucht. Als Arbeitselektrode diente eine unbehandelte Platin-Dickschichtelektrode, an die kein festes Potential angelegt wurde, sondern bei der das Potential im Bereich von -1 V bis +1 V mit konstanter Geschwindigkeit (50 mV/s) variiert wurde. Es wurden Voltamogramme für Clark & Lubs-Puffer pH 8 (Abb. 25, schwarz), 0,1 mM (rot) und 1 mM Xanthin (blau) aufgezeichnet.

Wie in Abb. 25 zu erkennen, zeigten die Xanthin-Voltamogramme die Ausbildung einer bei +400 mV beginnenden Stromwelle, die ihren Maximalwert bei etwa +700 mV erreichte. In reinem Clark & Lubs-Puffer wurde dieser Elektrodenprozeß nicht beobachtet, so daß der Stromanstieg allein auf die Oxidation von Xanthin zurückzuführen war.

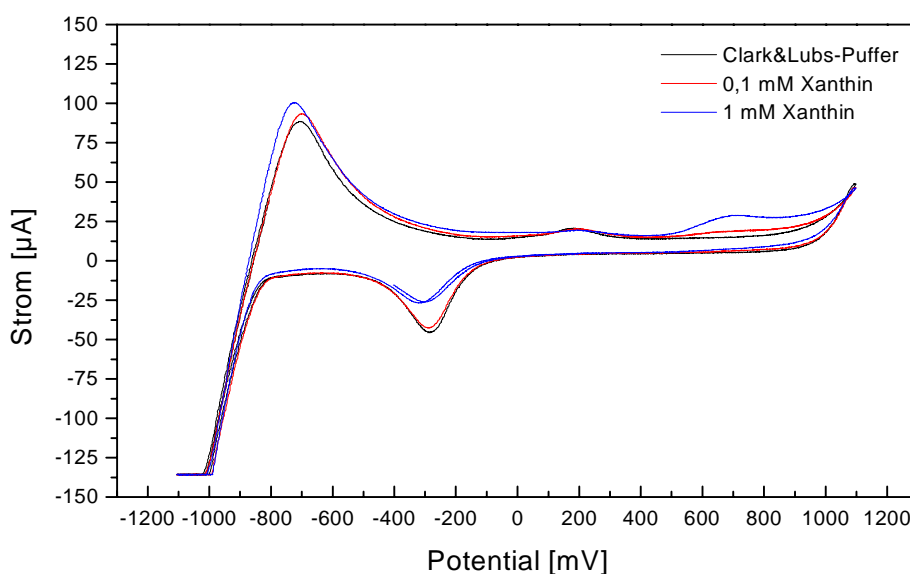


Abb. 25: Cyclovoltammogramm von Xanthin an einer unbeschichteten Pt-Dickschichtelektrode, Durchlaufgeschwindigkeit: 50 mV/s

Die Untersuchung enzym-unabhängiger durch die Direktoxidation von Xanthin hervorgerufener Signale wurde anschließend im Ein-Kanal-FIA-System wiederholt. Über die Injektion einer 1 mM Xanthin-Lösung wurde der aus der Xanthin-Oxidation resultierende Stromfluß an einer Pt-Elektrode bei verschiedenen Arbeitspotentialen bestimmt. Um den Einfluß der an der Arbeitselektrode angelegten Spannung auch auf eine reine H_2O_2 -Oxidation zu überprüfen, wurde im Anschluß an die Xanthin-Lösung eine 1 mM H_2O_2 -Lösung injiziert. Wie unter 2.2.7 erläutert ist es möglich, Interferenzen durch den Einsatz von Mediatoren als Elektronenakzeptoren zu unterdrücken, da diese im Vergleich zu H_2O_2 schon bei deutlich geringeren Potentialen als +600 mV an einer Elektrode oxidiert werden können. Um diesen Effekt ausnutzen zu können und damit die Xanthin-Direktoxidation durch eine Herabsetzung des Potentials zu unterbinden, wurden dem Carrier-Puffer 5 mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ zugesetzt. Zunächst wurde auch hier durch die Injektion eines Xanthin-Standards (1 mM) überprüft, welchen Einfluß der Mediator-Zusatz bei verschiedenen Potentialen auf die Höhe des unspezifischen Signals ausübte. In Tabelle 14 sind die bei den jeweiligen Potentialen gemessenen Stromstärken zusammengefaßt:

Potential [mV]	H ₂ O ₂ -Signal C&L-Puffer	Xanthin-Signal C&L-Puffer	Xanthin-Signal C&L/Fe(CN) ₆ ³⁻ -Puffer
600	20,7 µA	3,6 µA	3,5 µA
500	19,6 µA	1,6 µA	2,1 µA
400	16,6 µA	0,66 µA	1,1 µA
300	14,6 µA	15 nA	0,43 µA

Tab. 14: Einfluß des Potentials auf H₂O₂-, Xanthin- und Xanthin/Mediator-Oxidation an Pt-Elektrode

Bei einem Potential von +600 mV betrug der enzym-unabhängige durch Direkt-oxidation von Xanthin hervorgerufene Strom 17,4% vom H₂O₂-Signal. Bei einer Verringerung des Arbeitspotentials nahm die Xanthin-Oxidation prozentual wesentlich schneller ab als das Vergleichssignal und war bei +300 mV mit einer Höhe von nur noch 15 nA vernachlässigbar gering, was in Übereinstimmung mit den in Abb. 25 gezeigten CVs stand. Das H₂O₂-Signal blieb mit 14,6 µA bei +300 mV zwar ausreichend groß, allerdings wurde die Empfindlichkeit im Vergleich zu einer Messung bei +600 mV um 30% herabgesetzt. Die beobachtete Potentialabhängigkeit der elektrochemischen Signale war auf den Elektronentransfer zwischen der jeweiligen Spezies und der Elektrode zurückzuführen, durch den die Geschwindigkeit des gesamten Prozesses bestimmt wurde. Mit der Verringerung des Potentials verlangsamte sich die Elektronenübertragung zunehmend, so daß ein sich immer weiter verringernder Stromfluß resultierte.

Dieser Mechanismus wurde durch die Beobachtung unterstützt, daß sich die prozentuale Differenz zwischen den Signalen, die jeweils bei einer Xanthin-Injektion in An- bzw. Abwesenheit des Mediators gemessen wurde, mit abnehmendem Potential vergrößerte. Bei 600 mV waren die Signale noch nahezu identisch, während sich das Mediator-Signal bei 400 mV bereits um den Faktor 1,7 und bei 300 mV sogar um den Faktor 29 erhöht hatte. In Abb. 26 sind nochmals zwei CV-Ausschnitte für 0,1 mM Xanthin bzw. 0,1 Xanthin/0,5 mM Fe(CN)₆³⁻ (rot) - jeweils in C&L-Puffer pH 8 gelöst - dargestellt. Da durch die Anwesenheit des Mediators allein kein Signal am Detektor erzeugt wurde, bei der Zugabe von Xanthin der Strom jedoch im Vergleich zur Messung in reinem Clark und Lubs-Puffer ohne Zusatz anstieg, kam es wahrscheinlich auch ohne die Vermittlung der Xanthin-Oxidase zu einem Elektronentransfer zwischen Xanthin und Fe(CN)₆³⁻. Das auf diese Weise gebildete Fe(CN)₆⁴⁻ wurde anschließend an der Elektrode re-oxidiert (s. Kap. 2.2.7).

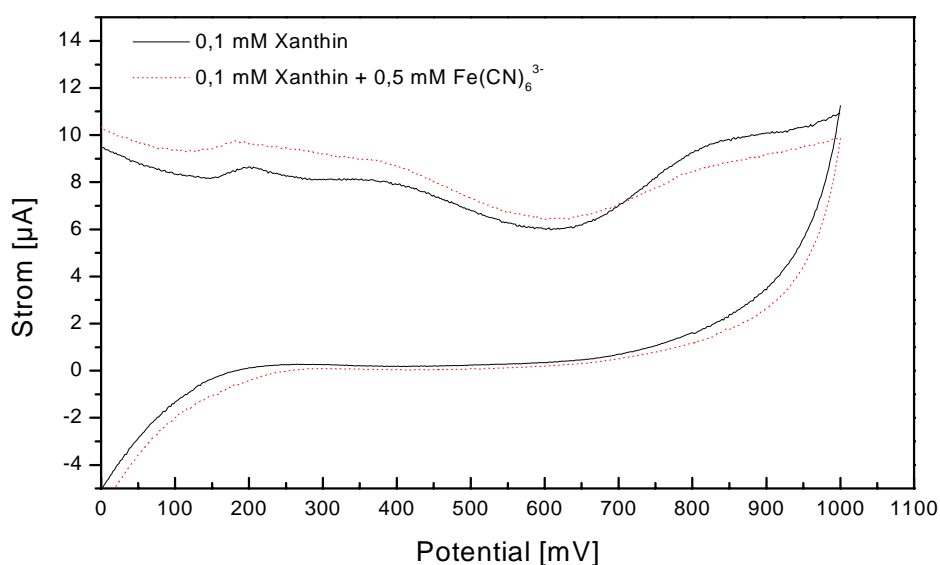


Abb. 26: CV für Xanthin und Xanthin/ $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$, Durchlaufgeschwindigkeit: 50 mV/s

Auch in diesem Fall zeigte sich, daß der Mediator-Zusatz im Vergleich zur reinen Xanthin-Lösung zu höheren Stromstärken führte. Im Gegensatz zu den Messungen im FIA-System wurde mit Hilfe der cyclischen Voltametrie auch bei einem Potential von +600 mV ein deutlicher Stromstärken-Unterschied zwischen Xanthin- und Xanthin/Mediator-Oxidation beobachtet. Allgemein ließen sich die höheren Signale damit erklären, daß aufgrund des Standardpotentials von -250 mV vs Pt, (Hamann und Vielstich, 1998; Stiene, 1997) für die $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ -Oxidation eine deutlich geringere Überspannung benötigt wurde und somit der Elektronentransfer zwischen Mediator und Elektrode im Vergleich zur Xanthin-Direktoxidation auch bei geringeren Potentialen beschleunigt ablief.

3.2.1.2 Einfluß einer BSA-Membran auf das unspezifische Signal

Um die elektrochemische Eigenoxidation von Xanthin bei höheren Potentialen zu vermeiden, und um eine möglichst große Empfindlichkeit der Wasserstoffperoxid-Umsetzung ausnutzen zu können, wurde die Arbeitselektrode mit einer Matrix bestehend aus 25 mg UV-polymerisierbarer Paste und 10 µl BSA-Lösung (100 mg/ml) als Diffusionsbarriere beschichtet. Mit diesem Detektor wurden die unter 3.2.1.1 durchgeführten Messungen wiederholt, die resultierenden H_2O_2 -, Xanthin- bzw. Xanthin/ $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ -Signale sind in Abb. 27 graphisch dargestellt. Die prozentualen

Angaben beziehen sich jeweils auf die Daten, die bei den jeweiligen Potentialen mit einer unbehandelten Pt-Dickschichtelektrode erhalten wurden (s. Tab. 14).

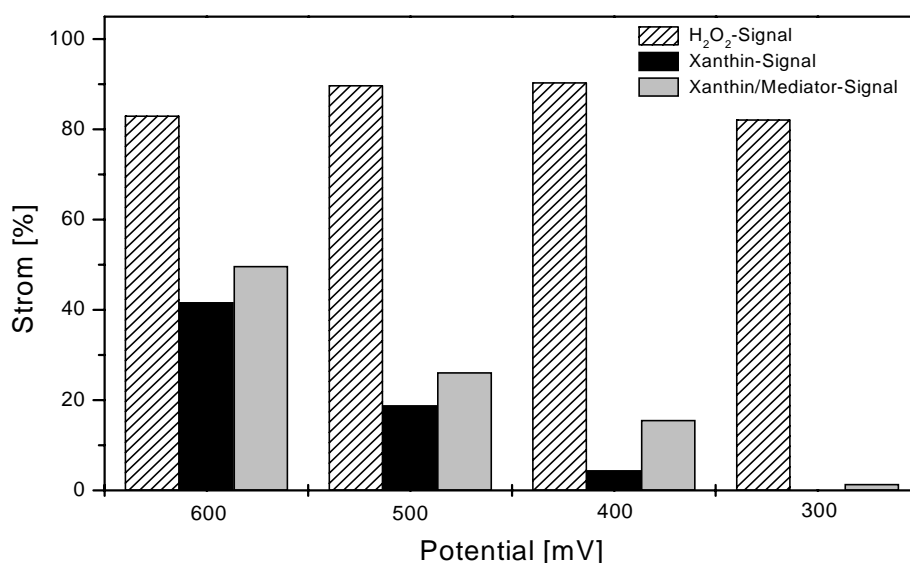


Abb. 27: Einfluß der BSA-Membran auf die Oxidation von H₂O₂, Xanthin und Xanthin/Fe(CN)₆³⁻

Die Durchlässigkeit der aufgetragenen Membran unterschied sich für die beiden Moleküle aufgrund ihrer Größe deutlich. Die H₂O₂-Signale verringerten sich im Vergleich zur Detektion an einer unbeschichteten Elektrode um etwa 10 bis 20%, blieben aber über den gesamten untersuchten Potentialbereich nahezu konstant. Der resultierende Strom war somit lediglich über die Diffusion des Wasserstoffperoxids durch die BSA-Membran limitiert (s. Gl. 6). Für die Xanthin-Direktoxidation wurde dieser Zusammenhang nicht beobachtet. Da die Xanthin-Diffusion durch die BSA-Schicht aufgrund der molekularen Größe im Vergleich zum kleineren H₂O₂ erschwert war, reduzierte sich das Signal bei einem Potential von 600 mV bereits um 60%. Bei einer weiteren Absenkung der Arbeitsspannung blieb es jedoch nicht konstant, sondern verringerte sich kontinuierlich bis es bei 300 mV nicht mehr detektierbar war. Im Gegensatz zu H₂O₂ wurde damit der in Gleichung 6 formulierte Zusammenhang zwischen der Schichtdicke der Diffusionsbarriere und dem resultierenden Grenzstrom nicht wiedergefunden. Da sich die Signale, die an der BSA-beschichteten Elektrode detektiert wurden bei den verschiedenen Potentialen prozentual unterschiedlich zu den Vergleichsmessungen an einer reinen Pt-Elektrode änderten, wurde die Höhe des Stroms nicht allein über die Dicke der BSA-Membran limitiert, sondern diese zusätzliche Schicht beeinflusste auch den

Elektronentransfer. Dieser Übergang stellte den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Gesamtreaktion dar, der sich bei einer Reduzierung des angelegten Potentials immer weiter verlangsamte und bei 300 mV schließlich zu keinem meßbarem Stromfluß mehr führte. Bei Anwesenheit von $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ im Carrier-Puffer und der Injektion von 1 mM Xanthin wurde ebenfalls eine Beeinträchtigung des Elektronentransfers durch die BSA-Membran beobachtet, der jedoch im Vergleich zur reinen Xanthin-Direktoxidation geringer ausfiel. Bei einem Potential von 600 mV verringerte sich der Strom um 50% und nahm weiter ab auf 29% (500 mV) bzw. 16% (400 mV) bis er mit nur noch 1,4% bei angelegten 300 mV vernachlässigbar klein blieb. Insgesamt erwies sich der Einsatz von $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ als nicht geeignet, da zum einen durch die Xanthin-Direktoxidation auch bei geringeren Potentialen Interferenzsignale hervorgerufen wurden und zum anderen auch ohne Enzymvermittlung ein Ladungstransfer zwischen Mediator und Xanthin stattfand, so daß es zu einer unspezifischen $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ -Oxidation an der Elektrode kam.

Unter der Annahme, daß XOD- und BSA-Membranen eine vergleichbare Durchlässigkeit für H_2O_2 bzw. Xanthin aufweisen, wurden nachfolgende Experimente mit XOD-UV-Elektroden bei einem Potential von 300 mV ohne den Zusatz eines Mediators durchgeführt.

3.2.1.3 Stabilität von XOD-UV-Elektroden

Die XOD-Elektroden wurden mit Hilfe des unter 2.2.3.2 beschriebenen Verfahrens per Enzymeinschluß hergestellt, indem 10 µl einer 200 mg/ml XOD-Lösung mit etwa 45 mg der UV-aushärtbaren Paste vermischt und auf die Arbeitselektrode aufgedruckt wurden. Zur Stabilisierung wurden der Enzymlösung die in Tabelle 15 aufgeführten Additive zugesetzt, die sich bereits in früheren Arbeiten zur Stabilisierung von Glucose- bzw. Lactat-Sensoren bewährt hatten (Rohm, 1996; Schumacher *et al.*, 1999). Die Stabilität der einzelnen Sensoren wurde im Ein-Kanal-FIA-System über 100 aufeinanderfolgende Injektionen einer 1 mM Xanthin-Lösung innerhalb einer Zeitspanne von 2,5 h untersucht (Abb. 28 a/b). Der Xanthin-Standard wurde in Clark & Lubs-Puffer pH 8 angesetzt, der auch als Carrier verwendet wurde.

Elektroden-Nr.	Zusatz zu 10 µl XOD-Lösung
1	-
2	5 µl BSA (10%ig)
3	5 µl Lactitol (50%ig)
4	5 µl Polylysin (20%ig)
5	5 µl Lactitol (50%ig)/Dextran (20%ig)
6	5 µl Lactitol/Dextran + 5 µl BSA (10%ig)
7	5 µl Polylysin (20%ig) + 5 µl BSA (10%ig)

Tab. 15: UV-Pasten-Additive zur Stabilisierung der XOD-Elektroden

Die mit einer XOD-Elektrode ohne weitere Pastenadditive und bei Anwesenheit von Lactitol erhaltenen Signale stiegen zunächst um bis zu 15% an, erreichten nach einer Meßdauer von etwa 15 min jedoch wieder den Ausgangswert und sanken anschließend kontinuierlich ab (Abb. 28a/schwarz und grün). Nach 100 Injektionen wurden mit einem Sensor ohne Supplemente nur noch 55% der ursprünglichen Signalhöhe erzielt. Ein ähnlicher Verlauf ließ sich bei dem Zusatz von Lactitol beobachten.

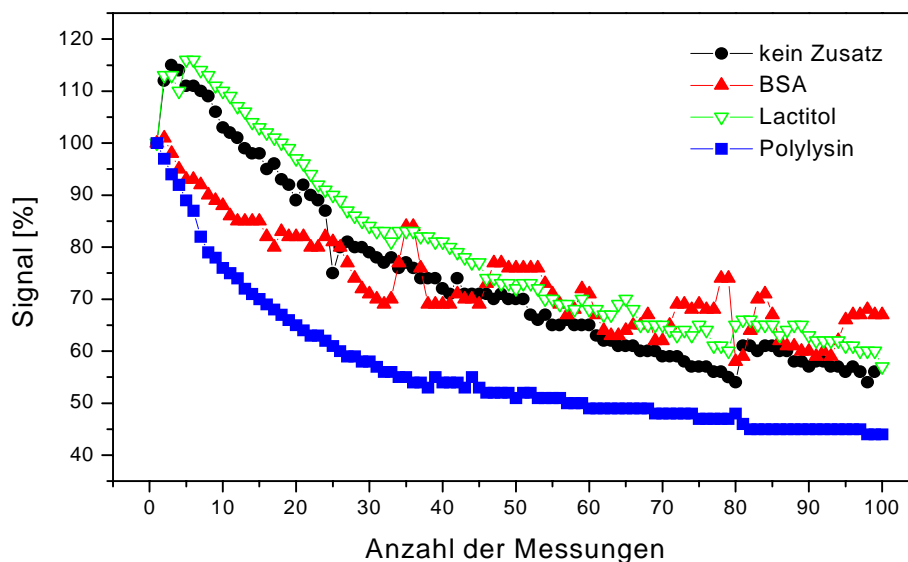


Abb. 28a: Stabilität von XOD-UV-Elektroden, Zusatz einzelner Additive

Mischungen aus Lactitol/Dextran und Lactitol/Dextran/BSA führten ebenfalls zu einer anfänglichen Erhöhung der Stroms, anschließend sanken die Signale jedoch auf bis

zu 38% ab (Abb. 28b/rot und grün). Der Zusatz von Polylysin (Abb. 28a/blau) bzw. Polylysin/BSA (Abb. 28b/blau) führte hingegen zu einer kontinuierlichen Abnahme der Signale auf 43 bzw. 30%.

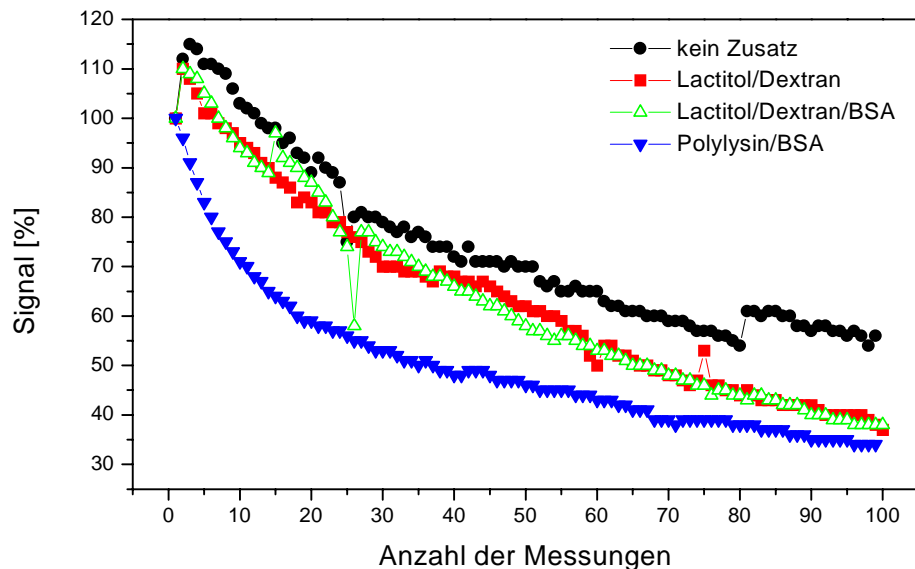


Abb. 28b: Stabilität der XOD-UV-Elektroden, Zusatz von Additiv-Mischungen

Im Gegensatz zu den bisher beschriebenen Sensoren wies die Elektrode mit BSA-Zusatz keinen eindeutigen Signalverlauf auf (Abb.28a/rot). Während der ersten 25 min verringerten sich die Signale zwar stetig, dann jedoch setzten Schwankungen der Stromstärke von bis zu 16% zwischen aufeinanderfolgenden Injektionen ein. Nach 100 Messungen wies das Signal noch 68% der Ausgangsintensität auf, und war daher den Messungen mit reinen XOD- und XOD-Lactitol-Sensoren vergleichbar. Allerdings war keine eindeutige Stabilisierung wie bei den zuvor getesteten Elektroden auf diesen Wert zu beobachten, da die Abweichungen der Messungen untereinander aus ungeklärten Gründen deutlich höher waren.

Neben den Zusätzen zur XOD-Lösung könnten auch die unterschiedlichen Enzym-Konzentrationen, mit denen die einzelnen Elektroden beschichtet wurden, die Stabilität der Sensoren beeinflusst haben. Durch das Vermischen der Enzym- mit den jeweiligen Additivlösungen verringerte sich die Enzymkonzentration von 200 mg/ml (Elektrode 1) auf 133 mg/ml (Elektroden 2-5) bzw. 100 mg/ml (Elektroden 6 und 7), so daß möglicherweise die geringere Stabilität der Elektroden 5 bis 7 im Vergleich zum reinen XOD-Sensor darauf zurückzuführen war, daß aufgrund der verringerten immobilisierten Enzymmenge nach der UV-Bestrahlung auch nur eine kleinere

Menge noch aktiver XOD in der Paste verblieb. Da die Kristallstruktur der Xanthin-Oxidase bis zum heutigen Zeitpunkt noch nicht aufgeklärt und damit die Ladungsverteilung auf der Proteinoberfläche unbekannt ist, ließen sich keine Rückschlüsse über mögliche die Enzymstabilität beeinflussende Wechselwirkungen geladener Oberflächengruppen mit den verschiedenen Supplementen ziehen. Jedoch müssen nicht ausschließlich solche direkten Wechselwirkungen zwischen XOD und einem Zusatzstoff für eine Beeinflussung der Aktivität verantwortlich gewesen sein, sondern denkbar wäre auch, daß einige dieser Stoffe das Enzym in der Paste besser vor der denaturierenden UV-Strahlung abschirmten, so daß ein größerer Anteil an aktiver XOD in der Membran verblieb. Aufgrund der Vielfältigkeit und Komplexität der möglichen Wechselwirkungen sowie der unbekannten Proteinstruktur können die beobachteten Effekte jedoch nur theoretisch diskutiert werden, auch weitere Experimente führten zu keinem Aufschluß über die Art der Wechselwirkungen.

3.2.1.4 Einfluß von Pastenzusätzen auf die Signalhöhen

Neben dem Einfluß der Additive auf die Sensor-Stabilität wurden auch die Auswirkungen dieser Substanzen auf die Höhe der Ausgangssignale untersucht (Abb. 29).

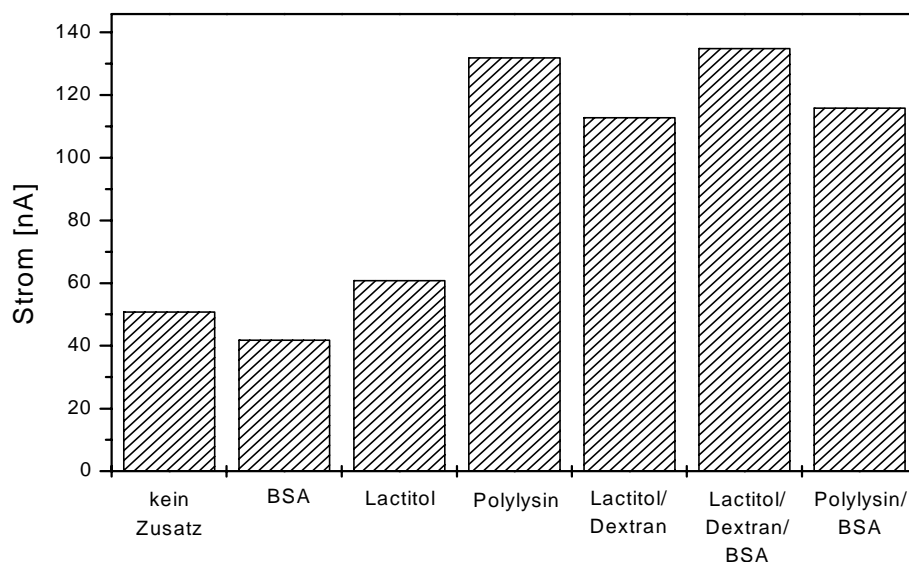


Abb. 29: Ausgangssignale der UV-XOD-Elektroden mit verschiedenen Pastenzusätzen

Der Zusatz von BSA, das bei pH 8 negativ geladen vorliegt ($pI = 4,8$, Yoshida *et al.*,

1993), führte zu einer Verringerung des Ausgangssignals um 17,6% im Vergleich zum reinen XOD-Sensor. Die Abnahme des Stromflusses war möglicherweise auf eine erschwerte Diffusion des Xanthins durch die XOD/BSA-Matrix zurückzuführen, da die Nukleobase aufgrund ihrer gleichsinnigen Ladung vom Additiv verstärkt elektrostatisch abgestoßen wurde. Der Einfluß der Ladung des jeweiligen Zusatzes auf die Höhe des amperometrischen Signals verdeutlichte sich bei der Vermischung der XOD-Lösung mit der neutral geladenen Substanz Lactitol bzw. mit dem positiv geladenem Additiv Polylysin. Die Anwesenheit von Lactitol in der Immobilisierungsmatrix führte bereits zu einer erleichterten Xanthin-Diffusion, so daß eine Signalerhöhung von 20% im Vergleich zur reinen XOD-Lösung auftrat. Durch den Zusatz von Polylysin wurde der Transport des entgegengesetzt geladenen Xanthins durch die aufgebrauchte Membran nochmals erleichtert, so daß sich die H_2O_2 -Oxidation um 159% erhöhte. Verschiedene Additiv-Mischungen, die der Enzymlösung zugesetzt wurden, übten ebenfalls einen positiven Effekt auf die Xanthin-Diffusion aus. Durch die Kombination von Lactitol mit dem positiv geladenem DEAE-Dextran erhöhte sich der Stromfluß um 122%. Enthielt diese Mischung zusätzlich noch BSA, das als einzeln zugesetztes Additiv das Signal im Vergleich zu Messungen mit einer reinen XOD-Elektrode reduzierte, wurde mit 135 nA (Signalerhöhung 165%) der größte Strom detektiert. Ungeklärt blieb in diesem Fall, warum der BSA-Zusatz in Kombination mit Lactitol und Dextran die Xanthin-Umsetzung nochmals begünstigte. Wurde die XOD-Lösung hingegen sowohl mit Polylysin als auch mit BSA vermischt, konnte der Einfluß des negativ geladenen Albumins wiedergefunden werden, indem sich das Signal zum XOD/Polylysin-Sensor um 32% verringerte.

Die Aktivität der einzelnen Elektroden wurde dabei nicht von dem molarem Enzym/Additiv-Verhältnis in der Immobilisierungslösung beeinflusst. Elektrode 2, die mit äquimolaren XOD- und BSA-Konzentrationen hergestellt wurde, zeigte eine geringere Stromstärke als Sensor 3 (XOD/Lactitol 1:1000), eine noch größere Aktivität wurde jedoch mit einem molarem XOD/Polylysin-Verhältnis von 1:2 erzielt (Elektrode 4). Die XOD-Aktivität wurde somit nicht durch die zugesetzte Menge, sondern durch die Art des Supplements bestimmt, was sich bei einem Vergleich der XOD/Lactitol- und XOD/Lactitol/Dextran-Elektrode besonders verdeutlichte. Beide Sensoren wurden in Bezug auf die XOD mit einem großen Lactitol-Überschuß produziert, die Zugabe einer geringen Menge Dextran (molares Verhältnis XOD/Dextran 10:1) führte jedoch zu einer Verdopplung der Stromstärke. Aufgrund der unbekannten XOD-Struktur war

es jedoch – wie zuvor schon erwähnt – nicht möglich die Wechselwirkungen mit den einzelnen Additiven weiter zu charakterisieren.

Berücksichtigt man bei der Interpretation der Aktivitäts-Daten auch die unter 3.2.1.3 erzielten Ergebnisse, so wird deutlich daß mit Elektrode 5 (XOD/Polylysin-Beschichtung) die höchsten Ströme gemessen wurden, dieser Sensor aber zugleich auch die geringste Stabilität aufwies. Der Grund hierfür lag wahrscheinlich in der erhöhten enzymatischen H_2O_2 -Produktion, die aus der erleichterten Xanthin-Diffusion resultierte, die aber wiederum zu einer Schädigung der XOD und somit zu einem schnell einsetzenden Aktivitätsverlust des Enzyms führte. Neben einer veränderten Xanthin-Diffusion durch die Enzymmembran könnten jedoch auch weitere XOD/Additiv-Wechselwirkungen oder auch Matrix-Effekte für das Verhalten der einzelnen Sensoren verantwortlich gewesen sein.

Allgemein waren die entwickelten Platin-Sensoren jedoch mit einer Empfindlichkeit im Bereich von 50 bis 94 nA/mM nicht geeignet, um die erfahrungsgemäß während einer Fermentation auftretenden Xanthin-Konzentrationen im Bereich von 5 bis 270 μM bestimmen zu können.

3.2.2 XOD-Graphit-Dickschichtelektroden

Da sich sowohl das Elektrodenmaterial Platin als auch die Immobilisierung der XOD innerhalb der UV-polymerisierbaren Paste aufgrund der mangelnden Stabilität als nur eingeschränkt geeignet zur Xanthin-Bestimmung erwiesen hatten, wurde mit Graphit ein weiteres Elektrodenmaterial getestet, auf das das Enzym in diesem Fall kovalent über EDC gekoppelt wurde.

3.2.2.1 Untersuchung unspezifischer Signale

Die unter 3.2.1.1 durchgeführten Untersuchungen zur Bestimmung unspezifischer Signale an Pt-Elektroden, wurden mit einer unbehandelten Graphit-Dickschichtelektrode wiederholt. Die aus der Injektion von 1 mM H_2O_2 , 1 mM Xanthin bzw. 1mM Xanthin/5 mM Kaliumhexacyanoferrat resultierenden Ströme sind in Tabelle 16 zusammengefaßt:

Potential [mV]	H ₂ O ₂ -Signal	Xanthin-Signal	Xanthin/Fe(CN) ₆ ³⁻ Signal
600	17,2 µA	1,5 µA	1,74 µA
500	17,6 µA	0,3 µA	0,55 µA
400	15 µA	30 nA	0,17 µA
300	12 µA	4 nA	6 nA

Tab. 16: Potentialeinfluß auf H₂O₂-, Xanthin- und Fe(CN)₆⁴⁻-Oxidation an einer Graphitelektrode

Auch an diesem Elektrodenmaterial wurde Xanthin bei einem angelegten Potential von 600 mV effektiv oxidiert. Das Signal betrug im Vergleich zur reinen H₂O₂-Oxidation 11,5%. Im Unterschied zu Platin lief der Elektronentransfer an Graphit bereits bei 400 mV so langsam ab, daß der resultierende Strom vernachlässigbar klein blieb. Bei diesem Potential war die Empfindlichkeit der H₂O₂-Detektion lediglich um 13% gegenüber einer Messung bei 600 mV herabgesetzt. Durch den Zusatz von Kaliumhexacyanoferrat zum Carrier-Puffer kam es wiederum zu einem Elektronentransfer zwischen dem Mediator und Xanthin und zu einer anschließenden Re-Oxidation des gebildeten Fe(CN)₆⁴⁻ an der Graphitoberfläche. Aufgrund des geringeren Standardpotentials des Mediators (s. S. 71) führte die Oxidation von Fe(CN)₆⁴⁻ auch bei 400 mV noch zu einem deutlich meßbarem Signal, das bei einem Potential von 300 mV jedoch auf 6 nA abnahm und damit nicht länger relevant war. Im Anschluß an diese Untersuchungen wurde die Elektrode elektrochemisch in einer Fe(CN)₆³⁻-Lösung aktiviert und über das EDC-Verfahren eine BSA-Membran (5 µl, 100 mg/ml) aufgebracht (Kap. 2.2.3.3). Die aus der Injektion einer 1mM H₂O₂- bzw. Xanthin-Lösung resultierenden Ströme, die an der aktivierten bzw. beschichteten Graphitelektrode detektiert wurden, sind in Abbildung 30 dargestellt. Die prozentualen Angaben beziehen sich jeweils auf die bei den entsprechenden Potentialen in Tabelle 16 angegebenen Werte.

In einem Potentialbereich von 300 bis 500 mV waren die an der unbehandelten (Tab. 16) bzw. aktivierten Graphitelektrode detektierten H₂O₂-Signale Balken nahezu identisch (Abb. 30, rote Balken ≈ 100%), so daß die Aktivierung ohne Auswirkung auf den resultierenden Stromfluß blieb, der in diesem Bereich allein durch die Diffusion bestimmt wurde.

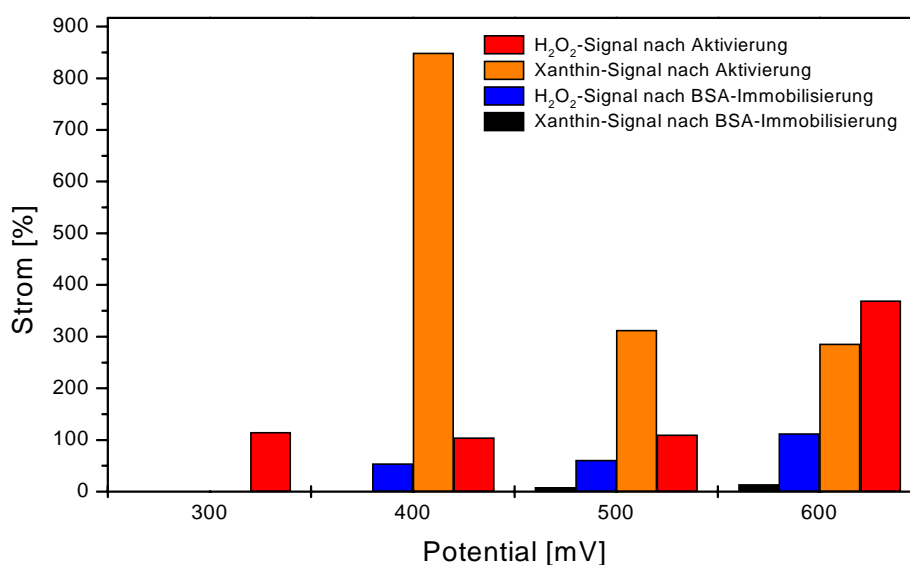


Abb. 30: H₂O₂- und Xanthin-Oxidation an einer aktivierten bzw. aktivierten und BSA-beschichteten Graphitelektrode

Bei 600 mV jedoch zeigte die Aktivierung einen deutlichen Einfluß auf die H₂O₂-Oxidation, indem sich das Signal um den Faktor 4 erhöhte. Möglicherweise wurde bei diesem Potential durch die Aufräuhung der Elektrodenoberfläche die Elektronentransfergeschwindigkeit beeinflusst, so daß es zu diesem Signalanstieg im Vergleich zu einer unbehandelten Graphitelektrode kam. Die Injektion der Xanthin-Lösung führte an der elektrochemisch vorbehandelten Elektrode zu einer allgemeinen Erhöhung der detektierten Ströme, da die Ablagerung der Mediatorschicht auf der Oberfläche eine spezifische Aktivierung für den Xanthin-Elektronentransfer darstellte. Wie bereits in den vorangegangenen Kapiteln diskutiert, wurde die Nukleobase durch Fe(CN)₆³⁻ zunächst oxidiert, der gemessene Stromfluß resultierte aus der anschließenden Re-Oxidation des auf diese Weise gebildeten Fe(CN)₆⁴⁻. Aufgrund des im Vergleich zur Xanthin-Direktoxidation beschleunigten Elektronentransfers von Fe(CN)₆⁴⁻ zur Elektrodenoberfläche, erhöhte sich durch die Aktivierung das Signal. Da diese vorgelagerte Redoxreaktion ausschließlich für Xanthin stattfand, blieb die Mediatorschicht ohne Einfluß auf die H₂O₂-Oxidation.

Die Immobilisierung einer BSA-Membran erwies sich zur Unterdrückung der enzymunabhängigen Xanthin-Signale als sehr effizient. Bei einem Arbeitspotential von 600 mV wurden im Vergleich zu einer unbehandelten Elektrode nur noch 14,3% des ursprünglichen Stromflusses detektiert, der bei geringeren Potentialen noch weiter

herabgesetzt wurde und bei 400 mV schließlich nicht mehr meßbar war. Auch in dieser Meßreihe dokumentierte sich die unterschiedliche Durchlässigkeit der Proteinschicht für H_2O_2 und Xanthin. Die Signale für Wasserstoffperoxid erfuhren mit Ausnahme der Messung bei 600 mV ebenfalls im Vergleich zur reinen Graphitelektrode eine Verringerung durch die aufgebraute Diffusionsbarriere, jedoch blieb diese mit 38,4% bei 500 mV bzw. 45,3% bei 400 mV hinter der Unterdrückung des Xanthin-Signals zurück.

Unter Berücksichtigung der erzielten Ergebnisse aus diesem Versuchsabschnitt wurden weitere Untersuchungen zur amperometrischen Xanthin-Bestimmung an elektrochemisch aktivierten Graphitelektroden bei einem Potential von 400 mV durchgeführt, wobei vorausgesetzt wurde, daß sich die immobilisierte XOD-Membran in Bezug auf ihre Durchlässigkeit für Xanthin ähnlich wie die BSA-Membran verhielt.

3.2.2.2 Stabilität von XOD-Graphitelektroden

Wie unter 3.2.1.2 beschrieben wurde mittels 100 aufeinanderfolgender Injektionen eines 1 mM Xanthin-Standards die Arbeitsstabilität der entwickelten XOD-Graphitelektrode untersucht (Abb. 31).

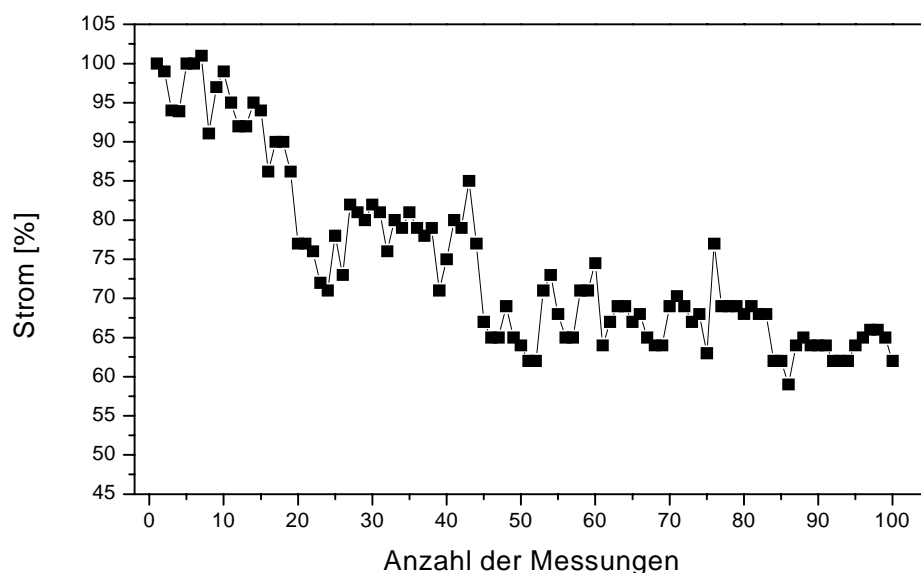


Abb. 31: Stabilität einer über EDC immobilisierten XOD-Graphitelektrode

Über einen Zeitraum von 2,5 Stunden sank das amperometrische Signal auf 62%

ab, wobei sich die Stromhöhe im Gegensatz zu den entsprechenden Untersuchungen mit Platinelektroden nicht kontinuierlich von Messung zu Messung verringerte, sondern eher sprunghaft abnahm. Die Graphit-Sensoren wiesen mit 64 nA/mM Xanthin eine vergleichbare Sensitivität zu der UV-XOD-Elektrode mit Lactitol-Zusatz auf. Im Hinblick auf die Xanthin-Konzentrationen, die im allgemeinen während einer Fermentation im Medium auftreten (5 – 270 μ M), war die Empfindlichkeit dieser Biosensoren jedoch zu gering, um Realproben vermessen zu können.

3.2.3 XOD-Reaktoren

Da die XOD-Elektroden weder die zur Bestimmung von Xanthin in Realproben nötige Sensitivität noch eine ausreichende Stabilität aufwiesen, wurde das Enzym auf Glas-Beads immobilisiert, die anschließend in eine säulenförmige Kartusche gefüllt und als Reaktor in das Fließsystem integriert wurden. Mit den Beads als Trägermaterial stand im Vergleich zur Elektrode eine wesentlich größere Oberfläche zur Verfügung, über die entsprechend mehr Enzym gebunden und somit eine größere Empfindlichkeit des Meßsystems erreicht werden konnte. Die amperometrische Detektion fand an einer Platin-Einfachelektrode (Abb. 4a) bei +600 mV statt.

Alle Untersuchungen zur Xanthin-Bestimmung mittels Enzym-Reaktoren wurden in dem bereits in Abbildung 9 dargestellten FIA-System durchgeführt, das im Zwei-Kanal-Modus betrieben wurde. 2 ml der Xanthin-Oxidase (2 mg/ml) wurden mittels der unter 2.2.3.1 beschriebenen Methode auf Glas-Beads immobilisiert und in einen Reaktor gefüllt. Unter identischen Bedingungen wurde ein zweiter Reaktor mit auf CPG (700 Å) gebundenem BSA hergestellt, anschließend wurden die Reaktoren in den entsprechenden Fließweg integriert. Die über das Injektionsventil in das System eingebrachte Xanthin-Probe wurde zunächst über den XOD-Reaktor geleitet und an der Elektrode detektiert, bevor sie ein zweites Mal injiziert und durch Umschalten der 2/3-Wege-Ventile über den im Fließweg 2 enthaltenen BSA-Reaktor dirigiert wurde. Das spezifische Xanthin-Signal wurde aus der Differenz der über die beiden Fließwege erhaltenen Signale berechnet.

3.2.3.1 Untersuchung unspezifischer Signale

Zur Unterdrückung unspezifischer Signale wurde die Oberfläche der Platin-Dickschichtelektrode auf unterschiedliche Weise modifiziert und das Verhältnis der über die beiden Reaktoren erhaltenen Signale nach Injektion einer Xanthin-Probe untersucht.

Auf die Elektrode wurde zunächst per Siebdruckverfahren eine Diffusionsbarriere aufgebracht, indem jeweils 10 µl unterschiedlich konzentrierter BSA-Lösungen mit 45 mg UV-Paste verrührt und auf der Sensoroberfläche ausgehärtet wurden.

Modifikation der Elektroden- oberfläche	unspezifisches (BSA/XOD-Reaktor) Signal in %		
	0,05 mM Xanthin	0,25 mM Xanthin	1 mM Xanthin
alte Elektrode, unbehandelt	53	40	39
neue Elektrode, unbehandelt	62	59	62
50 mg/ml BSA-Membran	33	38	55
100 mg/ml BSA-Membran	43	43	56

Tab. 17: Einfluß von siebgedruckten BSA-Membranen auf das unspezifische Signal

Das unspezifische über den BSA-Reaktor bestimmte Signal hatte für die gewählten injizierten Xanthin-Konzentrationen - mit Ausnahme der zuvor noch nicht verwendeten unbehandelten Elektrode - unterschiedliche prozentuale Anteile (Tab. 17). Mit einer bereits mehrfach eingesetzten unbehandelten Elektrode nahm der Anteil des unspezifischen Signals mit zunehmender Xanthin-Konzentration ab, während mit den beschichteten Sensoren der gegenteilige Effekt beobachtet wurde. Die Unterdrückung der Xanthin-Direktoxidation zeigte dabei keine Abhängigkeiten von der BSA-Konzentration in der gedruckten Membran. Das bessere mit einer *gealterten* unbehandelten Elektrode erzielte Verhältnis war wahrscheinlich auf Ablagerungen von Puffer- oder Probenbestandteilen zurückzuführen, durch die die Oberfläche verschmutzt und damit deaktiviert wurde, so daß der Sensor bezogen auf eine noch unbenutzte Elektrode ein vergleichsweise weniger empfindliches Ansprechverhalten und somit kleinere absolute Peakhöhen zeigte. Die Existenz eines solchen *Schmutzfilms* bei einer *gealterten* Elektrode erleichterte die Anlagerung weiterer Bestandteile und führte so zu einem Anwachsen der Schicht. Aufgrund der unterschiedlichen Größe des Xanthins und des aus der enzymatischen Umsetzung resultierenden Wasserstoffperoxids wurde der Durchtritt des kleineren

Moleküls noch stärker begünstigt, was zu einer Abnahme des unspezifischen Signalanteils führte.

Das in Bezug auf die Xanthin-Konzentration reziproke Verhalten BSA-beschichteter Elektroden war auf einen diffusions-kontrollierten Stofftransport zur Elektrode zurückzuführen, wobei die resultierende Grenzstromdichte mit einer Erhöhung der Analyt-Konzentration und mit der Abnahme der Diffusionsschichtdicke linear ansteigt (s. Gl. 6). Der unspezifische Signalanteil stieg im Vergleich zum spezifischen mit zunehmender Xanthin-Konzentration an, da die erhöhte Analytmenge nicht mehr vollständig von der XOD zu H_2O_2 konvertiert werden konnte und somit über den Fließweg 1 mehr nicht umgesetztes Xanthin bis zum Detektor gelangte. Aufgrund des größer werdenden Konzentrationsunterschiedes wurde der Stofftransport von Xanthin durch die Diffusionsmembran beschleunigt und damit das durch die Xanthin-Direktoxidation hervorgerufene Signal erhöht. Auf der anderen Seite stieg die H_2O_2 -Produktion aufgrund der einsetzenden Enzymsättigung bei höheren Xanthin-Konzentrationen nicht länger linear an, so daß hierdurch ein Grenzwert für die Höhe des spezifischen Signals erreicht wurde, der zu einem ungünstigeren Verhältnis beider Signalanteile führte.

Neben der Immobilisierung einer Proteinschicht wurde eine einfache APTS-Silanisierung (Kap. 2.2.3.1) als weiteres Oberflächenmodifizierungsverfahren eingesetzt. Vor der Silanisierung zeigte die bisher noch nicht verwendete Elektrode mit einem unspezifischen Signalanteil von 50% bis 63% das bereits beobachtete Verhalten (Tab. 18). Durch die Silanisierung des Detektors wurde die Xanthin-Direktoxidation jedoch effizienter unterdrückt als mit Hilfe einer immobilisierten Proteinmembran.

Der Silanisierungsprozeß ähnelt sehr stark der Herstellung eines *Sol-Gels*. Bei diesem Verfahren wird eine Schicht von porösem Silicat auf einem Träger erzeugt, indem als Precursor dienende Alkoxysilane - wie beispielsweise APTS oder Tetramethoxysilane - hydrolysiert werden. Die sich bildende kolloidale Suspension (*Sol*) geht anschließend durch Trocknung in ein Gel über (Tsionsky *et al.*, 1994). Über die Behandlung der Elektrode mit APTS wurde eine *sol-gel-ähnliche* Schicht erzeugt, die als Abschirmung für das darunterliegende Platin fungierte.

Xanthin-Konz.	unbehandelte Elektrode			silanierte Elektrode		
	XOD-Signal	BSA-Signal	Hintergrund	XOD-Signal	BSA-Signal	Hintergrund
50 μM	256 nA	128 nA	50 %	220 nA	80 nA	36%
100 μM	512 nA	288 nA	56%	440 nA	120 nA	27%
250 μM	1096 nA	640 nA	58%	820 nA	180 nA	22%
500 μM	1620 nA	1020 nA	63%	960 nA	200 nA	21%

Tab. 18: Einfluß der Silanisierung auf Höhe und Verhältnis von spezifischem und unspezifischem Signal

Diese Gelschicht stellte eine Diffusionsbarriere mit geringer Schichtdicke dar, die aber dennoch einen unterschiedlichen Einfluß auf die Xanthin- bzw. H_2O_2 -Oxidation ausübte. Aufgrund seiner Größe wurde Xanthin effektiver abgeschirmt als das kleinere Wasserstoffperoxid, was sich mit ansteigender Analyt-Konzentration immer stärker bemerkbar machte und so zu einer Erhöhung des spezifischen Signalanteils führte. Das Ansprechverhalten des silanierten Detektors ähnelte damit dem einer *gealterten* mit einem *Schmutzfilm* überzogenen Elektrode. Die unbehandelte neue Elektrode zeigte in Bezug auf die Xanthin-Konzentration ein reziprokes bereits zuvor diskutiertes Verhalten.

Zusammenfassend erwies sich die über die Silanisierung der Platinelektrode aufgebrachte $(\text{Si-O})_n$ -Matrix als das am besten geeignete Verfahren zur Unterdrückung der enzym-unabhängigen Xanthin-Signale, daher wurde zu Beginn jedes Meßtages die zur amperometrischen Detektion verwendete Elektrode neu silanisiert.

3.2.3.2 Trägermaterial und Aktivierungsmethode

Als Immobilisierungsmatrix wurden in dieser Versuchsreihe CPGs verschiedener Größe sowie nicht poröse Glas-Beads und Eupergit C eingesetzt. Aktiviert wurden die Glasträger über die unter 2.2.3.1 bzw. 2.2.3.3 beschriebenen APTS- und GOPS-Verfahren. Zur Kopplung auf Eupergit wurden dessen aktivierte Oberflächengruppen ausgenutzt. Die jeweiligen Reaktoren wurden in das Fließsystem eingesetzt, zur Bestimmung des unspezifischen Signalanteils wurde die Xanthin-Probe nach der zweiten Injektion über einen Reaktor geleitet, der auf CPG (APTS-aktiviert, 700 Å)

immobilisiertes BSA enthielt.

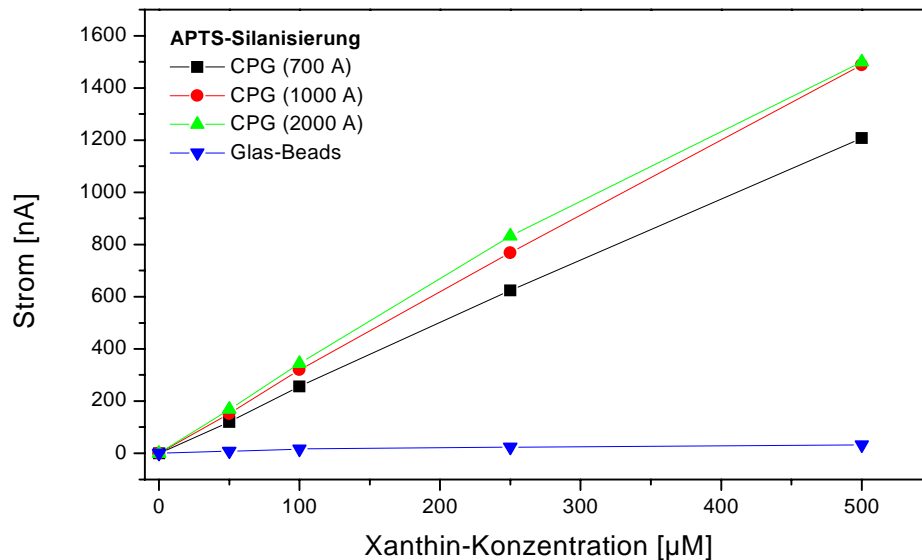


Abb. 32: Vergleich verschiedener APTS-aktivierter Trägermaterialien zur XOD-Immobilisierung

In Abbildung 32 sind zunächst die Kalibrierkurven dargestellt, die mit APTS-aktivierten porösen (CPG) und nicht porösen Glas-Beads erzielt wurden. Hierbei zeigte sich deutlich die bessere Eignung der porösen Glasträger als Immobilisierungsmatrix. Aufgrund der Porosität vergrößerte sich Oberfläche des Trägermaterials, so daß mehr Enzym gebunden und die Empfindlichkeit des Detektionssystems bis zu einem Faktor von 18,75 im Vergleich zu den Glas-Beads gesteigert werden konnte. Die Bedeutung der Poren für eine erfolgreiche XOD-Immobilisierung spiegelte sich auch im Vergleich der verschiedenen CPGs untereinander wider, denn mit zunehmender Porengröße erhöhte sich auch die Sensitivität des enzymatischen Systems. Zur Immobilisierung von Proteinen wie der Xanthin-Oxidase mit einem Molekulargewicht von 300 kDa (Rastelli *et al.*, 1997) wird vom Hersteller CPG mit einer Mindestporengröße von 1400 Å empfohlen (Fluka, 1999). Ein Trägermaterial mit kleineren Poren eignet sich demnach zur Kopplung von Substanzen mit einem Molekulargewicht von 250 kDa (1000 Å) bzw. 130 kDa (700 Å). Diese Empfehlung wurde durch die erzielten Ergebnisse bestätigt, indem die Immobilisierung der Xanthin-Oxidase auf CPG mit einer Porengröße von 2000 Å am effektivsten verlief. Durch die erweiterte Größe der Poren wurde die Diffusion der XOD erleichtert, so daß die vergrößerte Oberfläche effizienter zur Immobilisierung ausgenutzt werden konnte. Aus der größeren gebundenen Enzymmenge resultierten letztendlich die

höheren detektierten Ströme. CPG erwies sich auch bei Verwendung einer GOPS-Aktivierung als besser geeignet im Vergleich zu den nicht porösen Glas-Beads und Eupergit C, jedoch nahm die Empfindlichkeit bei diesem Verfahren deutlich gegenüber den CPG-APTS-Beads ab (Abb. 33). Die geringe gebundene Enzymmenge bei einer Immobilisierung auf Eupergit, Glas-Beads bzw. GOPS-aktiviertem CPG machte sich auch durch eine Verkürzung des linearen Meßbereiches im Vergleich zu APTS-aktiviertem CPG bemerkbar. Aufgrund einer identischen Dispersion und Sauerstoff-Verfügbarkeit im Fließsystem ließ sich diese Verkleinerung nur auf eine Reduzierung der gekoppelten XOD-Menge zurückführen.

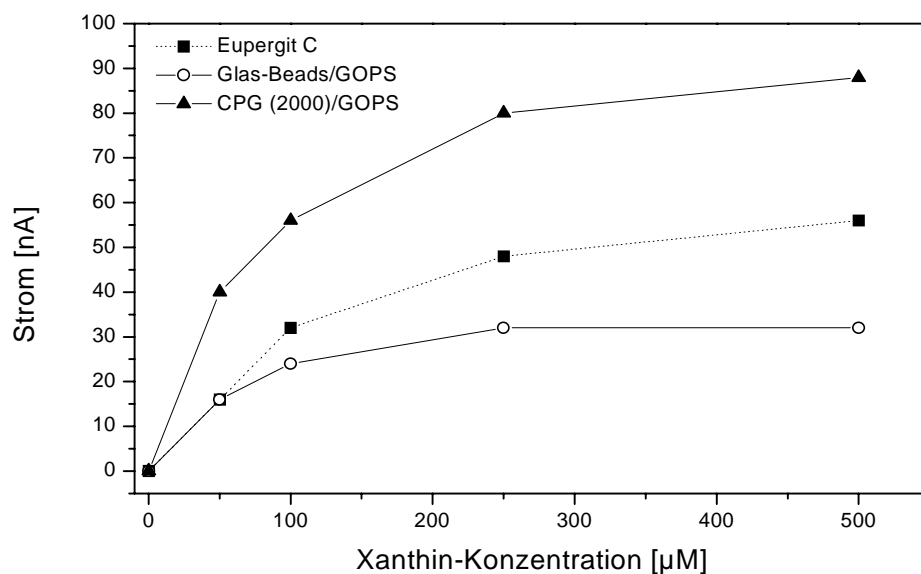


Abb. 33: Einfluß der GOPS-Aktivierung auf die XOD-Immobilisierung bei Verwendung verschiedener Trägermaterialien

Als Konsequenz aus dieser Versuchsreihe wurde für weitere Experimente die Xanthin-Oxidase auf APTS-aktiviertes CPG gekoppelt, das eine mittlere Porengröße von 1000 Å bzw. 2000 Å aufwies.

3.2.3.3 Einfluß von EDTA und pH-Wert

Da der Komplexbildner EDTA kommerziellen XOD-Suspensionen zugesetzt wird, wurde sein Effekt auf das entwickelte Detektionssystem als Carrier-Bestandteil untersucht. Abbildung 34 zeigt die resultierenden Signale mit und ohne Zusatz von 0,5 mM EDTA zum Trägerstrom (Clark & Lubs pH 8).

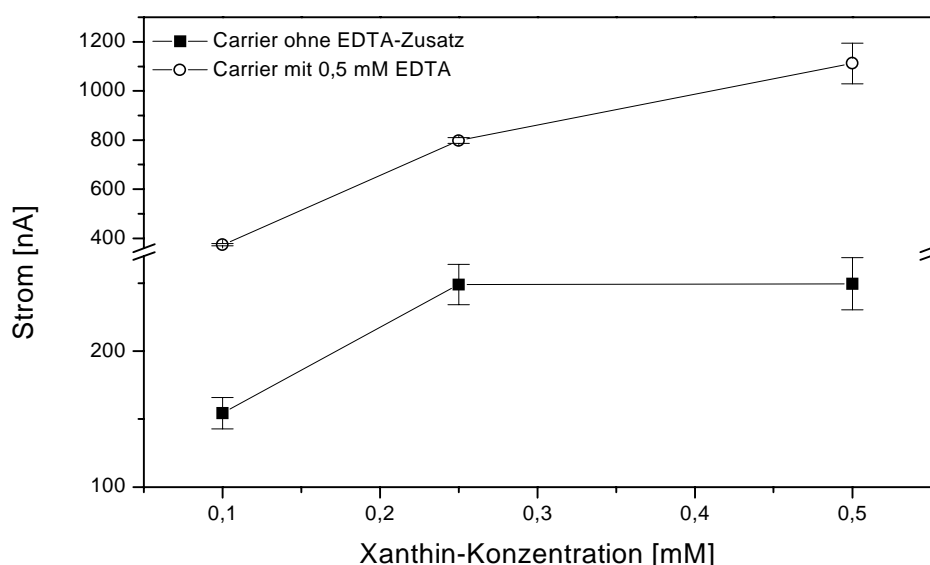


Abb. 34: Einfluß von 0,5 mM EDTA als Carrier-Zusatz auf das amperometrische Signal

Das Signal wurde bei Anwesenheit von EDTA um einen Faktor von etwa 3 erhöht. Dies wurde auf eine positive Wechselwirkung mit der Xanthin-Oxidase direkt sowie auf eine Aufhebung des *Elektroden-Fouling-Effektes* zurückgeführt, der häufig bei amperometrischen Langzeit-Messungen mittels Dickschichtelektroden beobachtet wird (Schmidt *et al.*, 1994). Dieses Phänomen wird vermutlich durch Metallionen verursacht, die auf der Sensoroberfläche abgelagert werden und somit die aktive Fläche, die zur elektrochemischen Oxidation zur Verfügung steht, verkleinern. EDTA wird als Komplexbildner dabei eine Stabilisierung des amperometrischen Signals durch die Umkehrung dieses Effektes zugeschrieben. Jedoch sollte die kritische Konzentration von 0,5 mM bei der EDTA-Zugabe nicht überschritten werden, da die Substanz selbst elektrochemisch aktiv ist und bei höheren Dosierungen Interferenzsignale hervorrufen würde (Rohm, 1996). Die Gegenwart von EDTA führte jedoch nicht nur zu einer höheren Stromdichte, sondern bewirkte auch eine Stabilisierung des Signals, so daß die Standardabweichung mit Ausnahme der höchsten eingesetzten Xanthin-Konzentration (7,5%) unter 2% lag. Bei Messungen ohne EDTA im Carrierstrom wurden in der Regel bei aufeinanderfolgenden Injektionen eines Xanthin-Standards Abweichungen von 5,9% bis 7,7% beobachtet.

Da die Xanthin-Oxidase ein pH-Optimum von 7,5 (Barman, 1969) besitzt, wurde in einer anschließenden Untersuchung überprüft, ob sich bei Verwendung eines

Carriers mit diesem pH-Wert eine weitere Erhöhung des amperometrischen Signals einstellen würde. Wie in Abbildung 35 jedoch gezeigt, bewirkte eine Absenkung des pH-Wertes auf 7,5 das Gegenteil. Im Vergleich zu pH 8 wurden geringere Ströme detektiert. Zurückzuführen war diese Signalabnahme auf die elektrochemische H_2O_2 -Umsetzung, die bei einem pH-Wert von 9 optimal abläuft (Rohm, 1996). Trotz des bei pH 7,5 erhöhten enzymatischen Xanthin-Umsatzes wurde dieser Effekt durch die Elektrodenreaktion überkompensiert. Ein pH-Wert von 8 stellte somit einen Kompromiß zwischen den optimalen Bedingungen der Enzym- und Elektrodenreaktion dar.

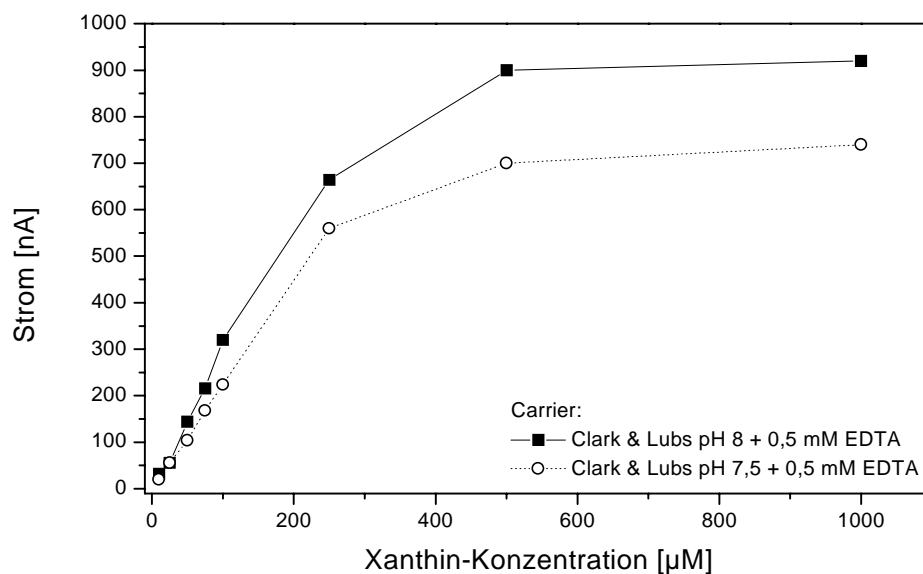


Abb. 35: Einfluß des pH-Wertes auf das amperometrische Xanthin-Signal

3.2.3.4 Arbeitsstabilität

Einen Langzeittest der optimierten XOD-Reaktoren zur Xanthin-Bestimmung mit Clark & Lubs-Puffer pH 8/0,5 mM EDTA als Carrierstrom zeigt Abbildung 36. Dargestellt sind die XOD-spezifischen Signale nach Subtraktion des unspezifischen über den BSA-Reaktor ermittelten Anteils. Unter den gewählten Bedingungen verringerten sich die Meßwerte innerhalb von 460 Injektionen (30,5 Stunden) über den XOD-Reaktor um 19,6%.

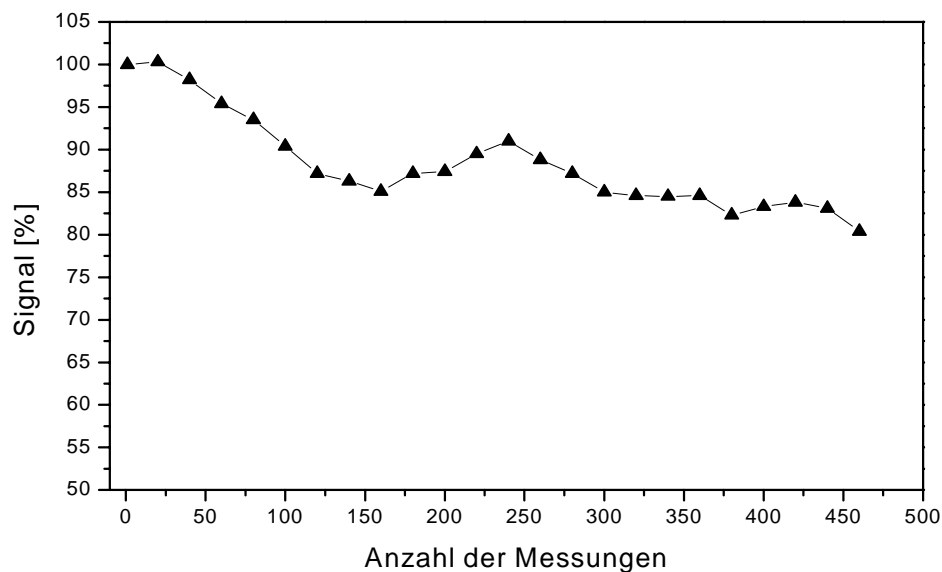


Abb. 36: Funktionelle Stabilität eines XOD-Reaktors, Injektionen von 100 μM Xanthin-Standard, 4 min/Messung

Die Reaktoren wiesen damit im Vergleich zu den XOD-Elektroden eine deutlich verbesserte Stabilität auf. Nach 100 Injektionen, entsprechend einer Meßdauer von etwa 6,66 Stunden, wurden noch 90,4% der ursprünglichen Signalintensität registriert. Wurde nicht die Anzahl der Messungen, sondern die Testdauer der Elektroden-Untersuchung (2,5 Stunden) als Bezugspunkt gewählt, stellte sich mit 97,4% die durch die Immobilisierung auf CPG verbesserte Enzymstabilität noch deutlicher heraus. Ursache hierfür war die Kopplung von mehr biologischem Material, die durch die größere zur Verfügung stehende Oberfläche erreicht wurde, so daß sich eine Inaktivierung der Xanthin-Oxidase erst später als auf den planaren Transducern durch verringerte Meßsignale bemerkbar machte. Darüber hinaus könnte sich eine Kopplung über Glutardialdehyd im Vergleich zum UV-Pastenein-schluß als schonenderes Immobilisierungsverfahren erwiesen haben, durch das eine größere enzymatische Restaktivität gewährleistet wurde.

3.2.3.5 Lagerstabilität

Die Reaktoren wurden bis zu ihrer erstmaligen Verwendung und auch zwischen einzelnen Meßreihen in Clark & Lubs-Puffer pH 8 mit einem Zusatz von 0,5 mM EDTA bei 4°C gelagert.

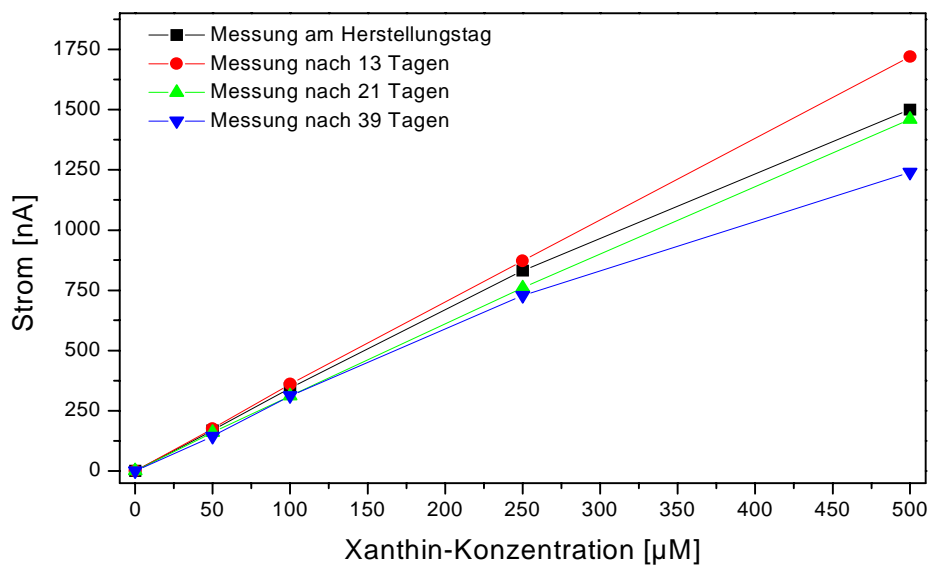


Abb. 37: Lagerstabilität der XOD-Reaktoren

Der XOD-Reaktor besaß am Tag seiner Herstellung eine Sensitivität von $3 \mu\text{A}/\text{mM}$ Xanthin im linearen Meßbereich (Abb. 37), die sich beim nächsten Einsatz nach 13 Tagen noch auf $3,34 \mu\text{A}/\text{mM}$ erhöhte, was möglicherweise auf leicht veränderte Fließbedingungen im Reaktor zurückzuführen war. Der dritte Einsatz des Reaktors nach drei Wochen führte mit $2,91 \mu\text{A}/\text{mM}$ zu einer im Vergleich zum Herstellungstag leicht herabgesetzten Empfindlichkeit. Die gute Lagerstabilität der XOD-Reaktoren blieb auch nach 39 Tagen mit einer Sensitivität von $2,48 \mu\text{A}/\text{mM}$ Xanthin erhalten. Diese Sensorsysteme waren demnach auch bei einer Lagerungsdauer von bis zu sechs Wochen zur Bestimmung von Xanthin unter Erzeugung ausreichend hoher Signale einsetzbar.

3.2.3.6 Einfluß des Mediums

Zur Bestimmung von Xanthin in Realproben war es nötig, den Einfluß des Mediums auf das amperometrische Signal zu überprüfen. Alle bisherigen Untersuchungen wurden mit in C&L-Puffer (pH 8) gelösten Standards durchgeführt, so daß keine weiteren als die durch das Xanthin selbst verursachten Interferenzen auftreten konnten. Das zur Hochzell-dichte-Fermentation von *E. coli* an der GBF verwendete Nährmedium war in seiner Zusammensetzung jedoch wesentlich komplexer (Tab. 19), so daß zunächst untersucht wurde, ob die Xanthin-Detektion durch

weitere von Medienkomponenten hervorgerufene Interferenzen beeinträchtigt wurde.

Komponente	Konzentration	Komponente	Konzentration
Glucose·H ₂ O	27,5 g/l	CuCl ₂ ·2H ₂ O	1,5 mg/l
KH ₂ PO ₄	13,3 g/l	H ₃ BO ₃	3 mg/l
(NH ₄) ₂ HPO ₄	4 g/l	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	4 mg/l
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1,2 g/l	Zn(CH ₃ COO) ₂ ·2H ₂ O	33,8 mg/l
Zitronensäure·H ₂ O	1,7 g/l	Fe(III)citrat	100,8 mg/l
EDTA	14,1 mg/l	Thiamin·HCL	4,5 mg/l
CoCl ₂ ·6H ₂ O	2,5 mg/l	Antifoam SP1	0,1 ml/l
MnCl ₂ ·4H ₂ O	15 mg/l	Ampicillin	50 mg/l

Tab. 19: Zusammensetzung des HDF-Mediums

Wie Abb. 38 entnommen werden kann, wurden durch das Ansetzen der Xanthin-Standards in HDF-Medium die über den XOD- und BSA-Reaktor erhaltenen Signale entgegengesetzt beeinflusst.

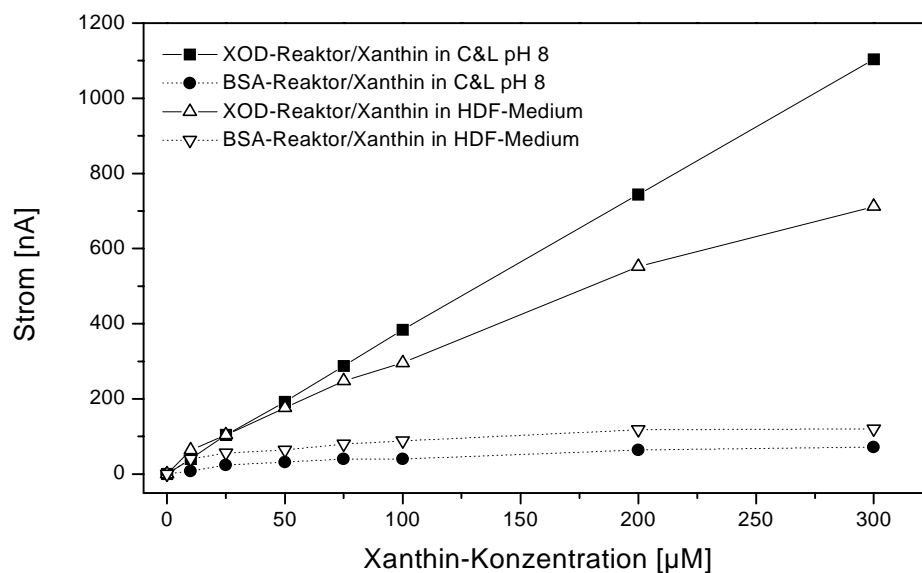


Abb. 38: Einfluß des Kultivierungsmediums auf das XOD- und BSA-Reaktor-Signal

Während die über den BSA-Reaktor detektierte Stromstärke aufgrund weiterer durch Medienbestandteile verursachter Interferenzen leicht anstieg, wurde das XOD-Signal erniedrigt. Ein möglicher Grund hierfür könnte in einer Maskierung des Xanthins

durch die komplexe Matrix gelegen haben, durch die die Substanz teilweise von der Xanthin-Oxidase nicht mehr als Substrat akzeptiert und die H_2O_2 -Erzeugung somit herabgesetzt wurde. Nach Subtraktion der unspezifischen Signale von den jeweiligen XOD-Reaktor-Signalen wurden für das Detektionssystem Sensitivitäten von 3,44 $\mu\text{A}/\text{mM}$ für in Puffer bzw. 2,02 $\mu\text{A}/\text{mM}$ für in HDF-Medium angesetzte Xanthin-Standards erreicht. Trotz des ungünstigeren Verhältnisses von spezifischem/unspezifischem Signalanteil erwies sich die Empfindlichkeit des entwickelten Biosensorsystems damit als ausreichend hoch, um Xanthin in Fermentationsproben bestimmen zu können.

3.2.3.7 Bestimmung von Xanthin in Realproben

Mit dem entwickelten Detektionssystem wurde die Xanthin-Konzentration von Realproben bestimmt, die während einer Hochzelldichte-Fermentation von *E. coli* (durchgeführt von Herrn M. Schmidt, Abt. Mikrobielle Systeme, GBF) genommen wurden. Der Sensor wurde zunächst mit in HDF-Medium angesetzten Standards kalibriert. Um eine mögliche Verringerung der XOD-Aktivität während der Meßreihe zu berücksichtigen, wurde jeweils nach drei Injektionen von Realproben eine Ein-Punkt-Kalibration mit einem 100 μM Xanthin-Standard durchgeführt und die ermittelte Xanthin-Konzentration um die jeweilige Abweichung korrigiert. Der lineare Meßbereich des Detektionssystems reichte von 0 bis 100 μM Xanthin mit einer Geradengleichung von: $Y = -0,38 + 1,75 \cdot X$ und einem Regressionskoeffizienten von 0,999. Proben mit einem Xanthin-Gehalt außerhalb dieses Bereichs wurden mit HDF-Medium entsprechend verdünnt und anschließend nochmals analysiert. Der so ermittelte Verlauf der extrazellulären Xanthin-Konzentration während einer über einen Zeitraum von 37,5 Stunden durchgeführten *E. coli*-Fermentation ist in Abb. 39 dargestellt. Die Konzentration des sekretierten Xanthins war stark an die der Hauptkohlenstoffquelle Glucose gekoppelt. Mit einer Abnahme der Glucose-Konzentration und dem in diesem Zusammenhang langsam einsetzenden Streß antworteten die Zellen mit dem Abbau ihrer rRNA, der zur Akkumulation von Xanthin im Medium führte. Die höchsten Werte für die Konzentration der Nukleobase wurden daher auch in der Phase der Kultivierung gefunden, in der praktisch keine Glucose mehr zur Verfügung stand. Daß dieses Signal eine regulatorische Bedeutung besaß, wurde durch die Abnahme der extrazellulären Xanthin-Konzentration nach der Glucose-

Zufütterung bei 35,35 Stunden deutlich. Xanthin wurde als zellulärer Streßmarker nach Aufhebung der akuten Hungersituation wieder in die Zellen eingeschleust, um die zuvor abgebaute rRNA zu regenerieren.

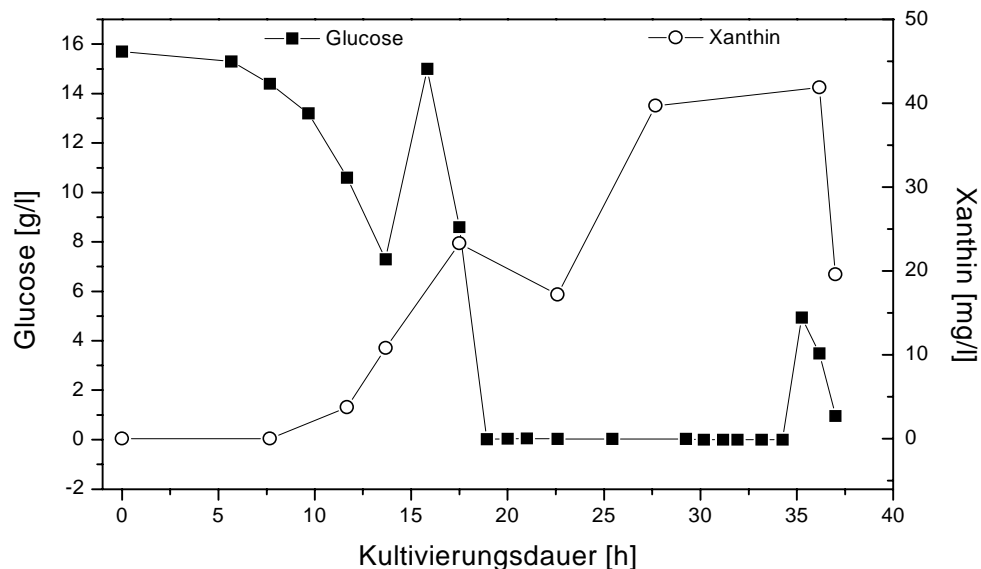


Abb. 39: Extrazelluläre Xanthin- und Glucose-Konzentration während einer *E.coli*-Fermentation (Ergebnisse der HPLC-Glucose-Analytik wurden von M. Schmidt Abt. Mikrobielle Systeme, GBF Braunschweig zur Verfügung gestellt)

Die in Abbildung 39 für Xanthin dargestellte Kurve zeigte gute Übereinstimmungen mit Konzentrationsverläufen, die in der Literatur für die Nukleobase Uracil während Hochzell-dichte-Kultivierungen von *E. coli* gefunden wurden (Rinas *et al.*, 1995). Auch hier wurde ein Anstieg der extrazellulären Uracil-Konzentration in Verbindung mit einer Glucose-Limitierung festgestellt. Es wurde neben dem Uracil auch eine Akkumulation des Xanthins beobachtet, die jedoch nicht exakt quantifiziert wurde, sich aber während des Fermentationsverlaufs über einen Bereich von 1 bis max. 50 mg/l erstreckte (Rinas, 1998), was durch die im Rahmen der vorliegenden Arbeit ermittelten Ergebnisse nochmals bestätigt wurde. Aufgrund der Tatsache, daß zu diesem Zeitpunkt keine HPLC-Referenz-Analytik durchgeführt werden konnte, ließ sich die Qualität der Biosensor-Resultate nicht weiter beurteilen. Da die Intention dieser Anwendung jedoch in der Hauptsache in der Aufklärung des Konzentrationsverlaufes und nicht in der Bestimmung absoluter Werte lag, hat sich das entwickelte System als sehr gut geeignet erwiesen, um Xanthin in komplexen Realproben detektieren zu können.

3.2.3.8. Probenahme über Dialysemodul

In Abschnitt 3.2.3.7 wurden mit Hilfe des entwickelten Systems die Xanthin-Konzentrationen von Fermentationsproben erfolgreich, jedoch *off-line* bestimmt, da über das verwendete konventionelle Injektionsventil eine technologisch einfache Anbindung an einen Bioreaktor zur *on-line* Überwachung unter Gewährleistung der Sterilität nicht realisierbar war.

Externe Analysegeräte lassen sich über automatisierte Probenahmemodule mit einem Fermenter koppeln. Hierfür stehen verschiedene Systeme zur Verfügung, über die ein Probenvolumen steril, reproduzierbar und schnell entnommen wird, so daß die Zeitverzögerung zwischen Probenahme und Detektion möglichst minimal ist. Neben einem Bypass-Probenahmemodul, über das die Fermentationsbrühe cyclisch aus dem Reaktor heraus und wieder zurück transportiert wird, kann auch ein Dialysemodul eingesetzt werden. Bei dieser Probenahmetechnik wird eine Edelstahlhülse verwendet, die in ihrem unteren verschlossenen Ende einen Fließweg enthält. Dieser ist mit im Inneren der Hülse verlaufenden Kapillaren verbunden (Abb. 40), über die das Probenahmemodul mit einem Fließinjektions-Analysesystem gekoppelt werden kann. Der offene Fließkanal des Moduls wird mittels einer permeablen Membran verschlossen, die darüber hinaus ein gemeinsames Autoklavieren der Probenahme-Vorrichtung mit dem Reaktor ermöglicht.

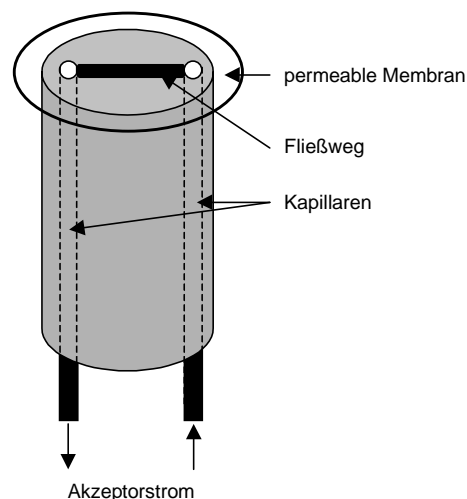


Abb. 40: Schematische Darstellung des Dialysemoduls

Die Probenahme selbst erfolgt über die Diffusion niedermolekularer Substanzen aus der Fermentationsbrühe durch die Membran in einen sogenannten Akzeptor-Pufferstrom, der durch den Kanal der Dialyseeinheit in das FIA-System gepumpt wird (Mohns, 1996). Da Diffusionsprozesse in der Regel langsam ablaufen, sind geringe Fließgeschwindigkeiten bzw. ein Stoppen des Akzeptorstroms nötig, um eine ausreichend hohe Analytkonzentration in diesem zu gewährleisten. Dem hierdurch entstehenden Nachteil einer Zeitverzögerung zwischen Probenahme und Detektion steht die positive Eigenschaft gegenüber, daß über die Variation der Fließgeschwindigkeit bzw. der Stoppzeit die Probe wenn nötig automatisch verdünnt werden kann.

Zur Simulation einer *on-line* Überwachung wurde ein Dialysemodul (Trace Biotech AG, Braunschweig) mit einer Polypropylenmembran, die einen *cut-off* von 10 kDa besaß, in den Probenloop des Injektionsventils integriert und in die Probenlösung getaucht. Beim Schalten des Ventils auf die Position *Füllen* wurde der Fließweg hinter der Membran mit dem Akzeptorstrom gefüllt und anschließend für 5 min angehalten (geringere Stoppzeiten führten zu keinen auswertbaren Ergebnissen), um die Diffusion des Xanthins zu erlauben. Nach dieser Stoppzeit und Umschalten auf die Ventilposition *Injektion* wurde das in den Akzeptor hineindiffundierte Probensegment über den XOD- bzw. BSA-Reaktor transportiert und an der Platin-Dickschichtelektrode analysiert.

Der Vergleich beider Probenahmesysteme zeigte für die Analyse in Clark & Lubs-Puffer pH 8 angesetzter Xanthin-Standards bei Verwendung des Dialysemoduls einen deutlich vergrößerten linearen Bereich (0 bis 500 μM) mit einer Empfindlichkeit von 1,55 $\mu\text{A}/\text{mM}$ (Abb. 41). Mit Hilfe des Injektionsventils wurde zwar eine höhere Sensitivität erreicht (2,16 $\mu\text{A}/\text{mM}$), jedoch lediglich in einem linearen Meßbereich, der sich von 0 bis 100 μM erstreckte.

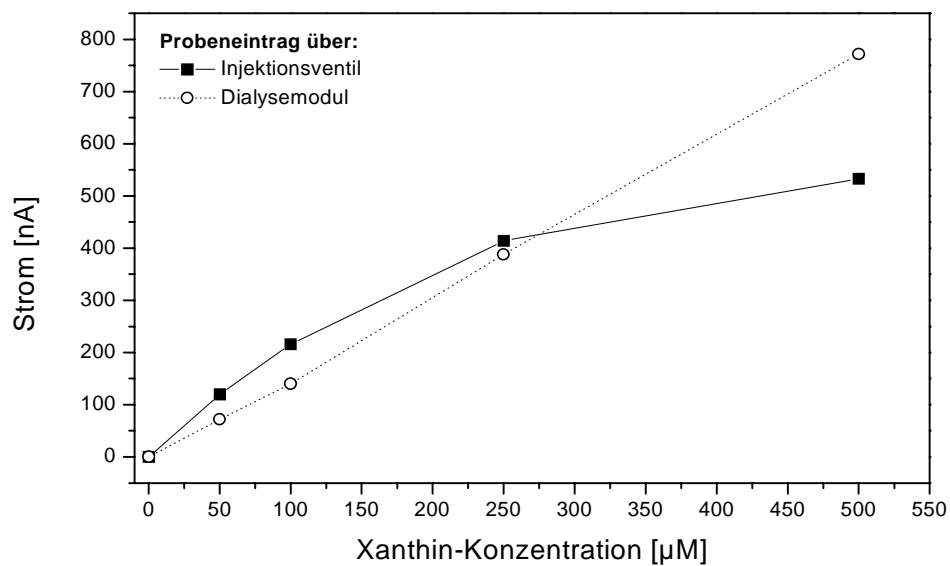


Abb. 41: Einfluß der Probeneintragsmethode auf die Analyse in Clark & Lubs pH 8 angesetzter Standards

Die Auftragung des spezifischen und unspezifischen Signalanteils in Abbildung 42 machte deutlich, daß bei Verwendung des Dialysemoduls die über beide Reaktoren detektierten Ströme im Vergleich zum Injektionsventil anstiegen.

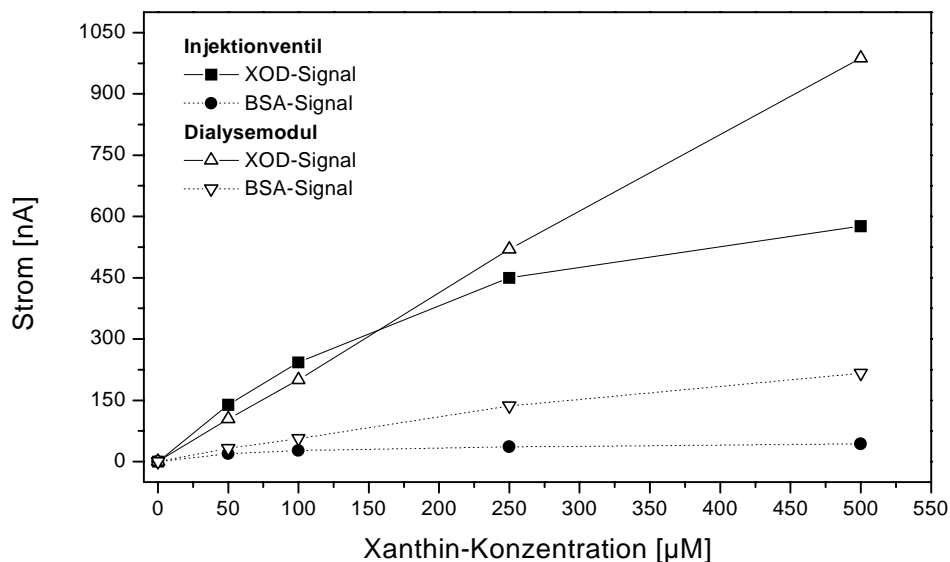


Abb. 42: Einfluß der Probeneintragsmethode auf das XOD- und BSA-Signal

Dies war auf unterschiedliche Volumina zurückzuführen, die durch den zusätzlichen Einbau des Dialysemoduls in den Probenloop des Ventils in das Fließsystem

eingebraucht und anschließend analysiert wurden. Durch die Art der Probenahme trat eine Veränderung des Dispersionskoeffizienten ein, der zu der Erweiterung des linearen Meßbereiches führte. Damit erwies sich das Dialysemodul zur Analyse von in Puffer angesetzten Xanthin-Standards trotz der leicht verringerten Sensitivität als besser geeignet, da Proben über einen größeren Konzentrationsbereich ohne vorgeschaltete Verdünnungsschritte analysiert werden konnten.

Wurden die Xanthin-Standards jedoch in HDF-Medium gelöst, sanken zum einen die Signale, die über beide Fließwege erhalten wurden deutlich ab (Abb. 43).

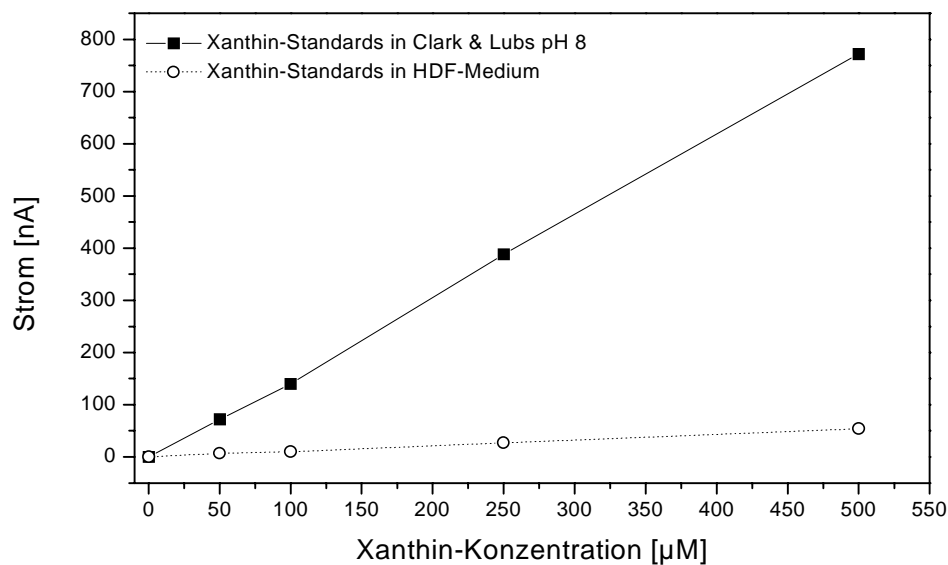


Abb. 43: Einfluß des HDF-Mediums auf den spezifischen Signalanteil bei Probeneintrag über das Dialysemodul

Zum anderen stellte sich ein deutlich ungünstigeres Verhältnis von spezifischem zu unspezifischem Signalanteil ein (Abb. 44), wodurch sich die resultierenden durch die enzymatische Umsetzung von Xanthin bedingten Ströme noch weiter verringerten. Die Absenkung des amperometrischen Signals um etwa 90% stand in Zusammenhang mit der komplexen Zusammensetzung des Mediums, die zu einer teilweisen Verschließung der Dialysemembran durch Ablagerungen einzelner Bestandteile und zu einer verringerten Xanthin-Diffusion führte, während der Membrandurchtritt für kleinere interferierende Komponenten weiterhin vergleichsweise leicht und schnell ablaufen konnte. Auch mit den in Medium angesetzten Standards von 0 bis 500 µM wurde ein linearer Zusammenhang zwischen spezifischem Signal und Xanthin-

Konzentration beobachtet, jedoch wurde die Empfindlichkeit mit 107 nA/mM um mehr als das Zehnfache herabgesetzt.

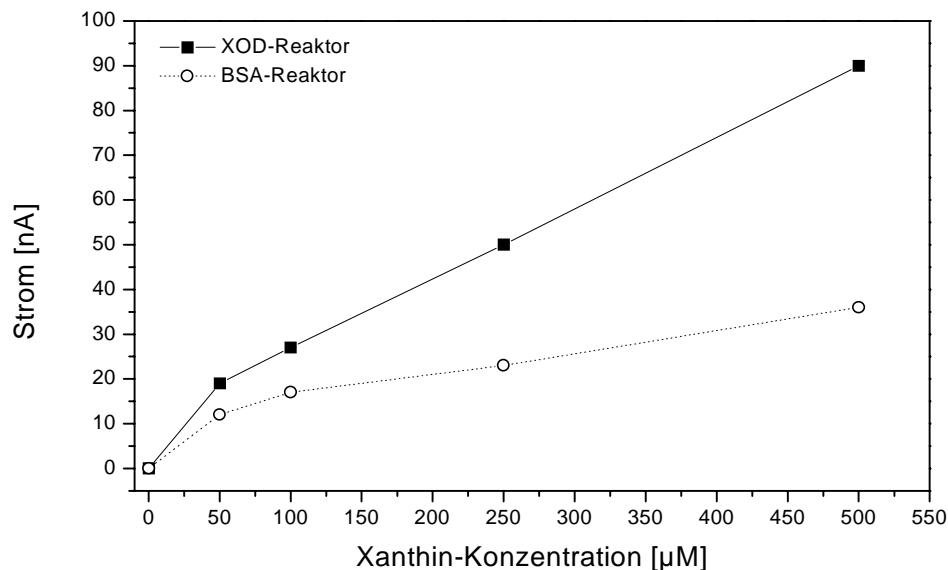


Abb. 44: Einfluß des HDF-Mediums auf das XOD- und BSA-Reaktor-Signal bei der Probenahme über das Dialysem modul

3.2.3.9 Realproben-Bestimmung über Dialysem modul

Proben einer weiteren Hochzelldichte-Fermentation von *E. coli* wurden unter Einsatz des Dialysem moduls im FIA-System analysiert und mit den Daten verglichen, die mittels konventioneller Injektion über ein Ventil erhalten wurden. Die Kalibrierung des Systems ergab mit dem Dialysem modul einen von 0 bis 1000 µM Xanthin reichenden linearen Meßbereich mit einer Empfindlichkeit von 116 nA/mM. Durch den weitreichenden linearen Bereich wurde gewährleistet, daß die Proben unverdünnt vermessen werden konnten. Dieses Verfahren machte jedoch ein Mindestvolumen von 15 ml erforderlich, um das nötige Eintauchen des Dialysem moduls in die Probe zu erlauben. Da diese Flüssigkeitsmenge nicht bei allen Proben zur Verfügung stand, konnten einige nicht mit in die vergleichende Untersuchung einbezogen werden.

In Tabelle 20 sind die in den einzelnen Fermentationsproben bestimmten Xanthin-Konzentrationen zusammengefaßt. Für die Messungen mit dem Injektionsventil

mußten einige Proben verdünnt werden, da der lineare Meßbereich mit einer Steigung von 1,77 $\mu\text{A}/\text{mM}$ hier nur bis maximal 100 μM Xanthin reichte.

Probe	Kultivierungsdauer	Verdünnung	direkte Injektion	Dialysem modul
1	6 h	- 1:2	2,8 μM 0 μM	- -
2	23,5 h	- 1:2 1:5	62 μM 73 μM 82 μM	- - -
3	25,5 h	- 1:2 1:5	66 μM 81 μM 87 μM	114 μM - -
4	28 h	- 1:2 1:5	72 μM 85 μM 98 μM	- - -
5	30 h	- 1:2 1:5	104 μM 132 μM 149 μM	247 μM - -
6	33 h	- 1:5 1:10	- 397 μM 524 μM	606 μM - -
7	34 h	- 1:5 1:10	- 421 μM 556 μM	556 μM - -
8	36 h	- 1:5 1:10	- 510 μM 622 μM	564 μM - -

Tab. 20: Xanthin-Bestimmung in Realproben im FIA-System über direkte Injektion bzw. Dialysem modul

Der direkte Vergleich der beiden Probeneintragsmethoden zeigte, daß über das Dialysem modul mit Ausnahme der letzten Fermenterprobe höhere Konzentrationen ermittelt wurden. Auffällig war hierbei der bei einer direkten Injektion auftretende Einfluß des Verdünnungsgrades der Probe. Die amperometrischen Signale erhöhten sich in der Regel im Vergleich zur unbehandelten Probe um 25% bei einer fünffachen bzw. 50% bei einer zehnfachen Verdünnung. Verantwortlich für die geringeren Signale der unverdünnten Proben waren wahrscheinlich hochmolekulare

Substanzen, die im Verlauf der Fermentation von den Zellen produziert und teilweise ins Medium sekretiert wurden. Diese Stoffe lagerten sich während der Messung auf der Oberfläche der Platin-Dickschichtelektrode ab und bildeten so eine zusätzliche die Diffusion des Xanthins beeinträchtigende Membran. Es handelte sich dabei jedoch nicht um eine permanente Diffusionsbarriere, sondern durch eine Verdünnung der Probe mit frischem Medium und Reduzierung der Konzentration an hochmolekularen Bestandteilen konnte die Elektrodenoberfläche zum großen Teil regeneriert werden, was durch das Ansteigen der Stromstärken dokumentiert wurde. Darin war auch begründet, daß mit einer höheren Probenverdünnung die mit beiden Methoden erzielten Ergebnisse besser übereinstimmten. Über den *cut-off* der Membran von 10 kDa gelangten bei einer Probenahme über das Dialysem modul hochmolekulare Bestandteile erst gar nicht in das Analysesystem. Der Detektor blieb somit vergleichsweise frei von Ablagerungen, was zu einer ungehinderten Xanthin-Diffusion und höheren Stromstärken führte.

Die gute Übereinstimmung des über beide Probenahmetechniken ermittelten Verlaufs der extrazellulären Xanthin-Konzentration ist nochmals in Abb. 45 dargestellt.

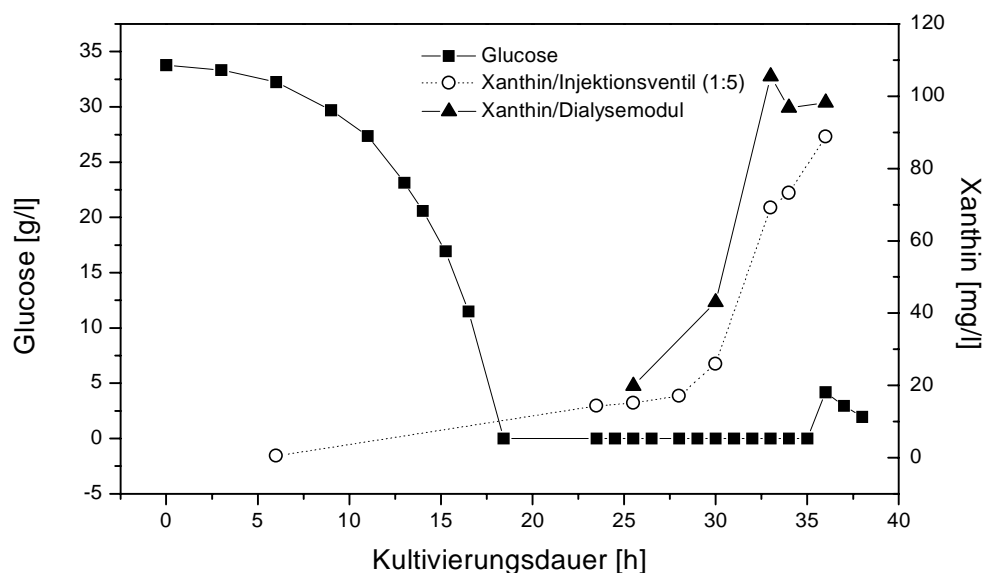


Abb. 45: Glucose- und Xanthin-Konzentrationsverlauf während einer Hochzelldichte-Fermentation von *E. coli*

Da zu diesem Zeitpunkt die Proben nicht über HPLC analysiert werden konnten, wurde wiederum die Glucose-Konzentration (HPLC-Daten zur Verfügung gestellt von

M. Schmidt, Abt. Mikrobielle Systeme, GBF) zur Diskussion der Daten herangezogen. Wie bereits bei der ersten Fermentation beobachtet, reagierten die Zellen auch hier mit einem rRNA-Abbau und einer daraus resultierenden Xanthin-Akkumulation auf die Limitierung der Kohlenstoffquelle. Durch die über einen Zeitraum von 17 h sehr lang andauernde Hungerphase wurden durch den permanenten RNA-Abbau Xanthin-Konzentrationen detektiert, die den maximalen Richtwert von 50 mg/l überschritten.

3.3. Trennung von Xanthin mittels Kapillarelektrophorese

3.3.1 UV-Detektion

Bis zum heutigen Zeitpunkt stellt die *on-column*-UV-Absorptionsdetektion die gebräuchlichste Nachweismethode dar, die zur Analyse über CE getrennter Proben verwendet wird. Dieser große Einsatzbereich läßt sich auf die Tatsache zurückführen, daß die Mehrzahl der zu analysierenden Substanzen eine Absorption im UV-Bereich aufweist. Darüber hinaus handelt es sich bei der UV-Absorption um einen bequemen und wenig aufwendigen Detektionsmodus, da er selten eine der Trennung vorgeschaltete Modifikation der Probe erfordert.

Die Absorption A läßt sich mathematisch durch das *Lambert-Beersche-Gesetz* beschreiben:

$$\text{Log} I/I_0 = A = -\varepsilon \cdot d \cdot c \quad (14)$$

Danach wird über den Quotienten I/I_0 die Abnahme der Lichtintensität I durch absorbierende Probenmoleküle im Vergleich zur ursprünglichen Intensität I_0 ausgedrückt. Die Absorption A hängt sowohl von dem molarem Extinktionskoeffizienten ε der betreffenden Substanz bei der ausgewählten Wellenlänge als auch von ihrer Konzentration c im Detektionsvolumen und der Schichtdicke d ab. Das im Rahmen dieser Arbeit verwendete CE-System besaß einen UV-Detektor mit variabler Wellenlänge, der die Kapillare quer durchstrahlte. Aufgrund dieser Anordnung stand mit dem mittleren Kapillardurchmesser nur ein sehr begrenzter Absorptionsweg zur Verfügung. Durch die zylindrische Form der Kapillare verringerte sich die effektive im

Vergleich zur nominellen (Kapillardurchmesser) Schichtdicke nochmals. Für eine querdurchstrahlte Kapillare kann die effektive Weglänge nach folgender Gleichung abgeschätzt werden:

$$d = (\pi \cdot \text{Kapillardurchmesser})/4 \quad (15)$$

Für die verwendeten Kapillaren mit einem Innendurchmesser von 50 µm würde damit eine effektive Schichtdicke von nur 39 µm resultieren. Aufgrund dieses verkürzten Weges werden bei einer UV-Detektion in der CE Sensitivitäten erreicht, die verglichen mit der HPLC um das 30- bis 100-fache geringer sind (Engelhardt, 1991).

3.3.1.1 UV-Detektion von Xanthin

Abbildung 46 zeigt ein im Wellenlängenbereich von 200 bis 400 nm aufgenommenes UV-Spektrum einer 200 µM Xanthin-Lösung:

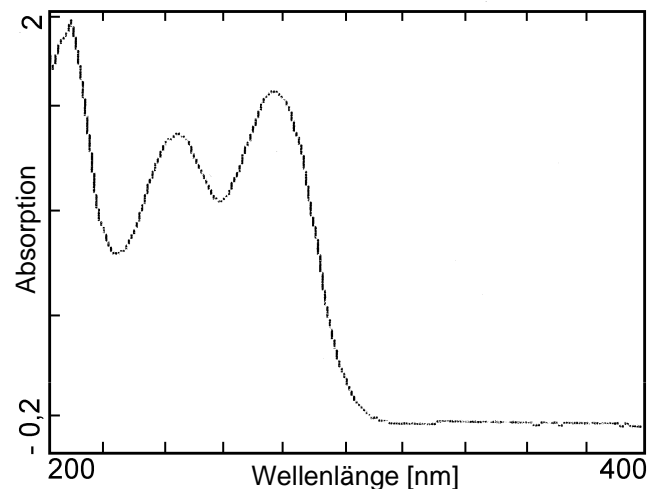


Abb. 46: UV-Spektrum von Xanthin, 200 µM Xanthin in 50 mM Borat-Puffer pH 8

Das Spektrum zeigte mit 210, 254 und 280 nm drei lokale Absorptionsmaxima. Diese drei gefunden Wellenlängen standen in sehr guter Übereinstimmung mit den in verschiedenen Veröffentlichungen zur Xanthin-UV-Detektion gewählten Wellenlängen (214 nm: Korman *et al.*, 1994; 254 nm: Bory *et al.*, 1996; 280 nm: Shihabi *et al.*, 1995). Die folgenden Untersuchungen wurden daher bei einer Detektionswellenlänge von 280 nm durchgeführt.

3.3.1.2 Separations-Spannung

Bei der elektrophoretischen Trennung einer Probe in einer Kapillare zählt die Höhe der angelegten Spannung zu einem der wichtigsten Parameter. Eine Erhöhung der Spannung kann viele Effekte mit sich ziehen, so wird beispielsweise die Wanderungsgeschwindigkeit der Probe und die elektroosmotische Fließgeschwindigkeit gesteigert und die Gesamtanalysendauer verkürzt. Darüber hinaus kann der Peak steiler werden und sich dadurch die Auflösung verbessern. Jedoch ist eine Potentialerhöhung auch mit einigen Nachteilen verbunden, z. B. einer größeren Produktion an Joulescher Wärme, die zur Aufrechterhaltung der Trennqualität effektiv abgeführt werden muß. Kann dies nicht gewährleistet werden, erwärmt sich die Kapillare, was zu einer verminderten Viskosität der Lösung führt. Diese wiederum bewirkt eine Erhöhung der elektroosmotischen Fließgeschwindigkeit, eine größere Ionen-Mobilität und Analyt-Diffusion, was schließlich in einer Bandenverbreiterung enden kann (Oda und Landers, 1997). Daher muß die Separations-Spannung sehr sorgfältig ausgewählt werden, um solche die Trennung negativ beeinflussende Effekte zu vermeiden.

Zur elektrophoretischen Trennung von Xanthin wurde ein in H₂O dest. angesetzter Standard (2 mg/l) über Druck (4 s) am anodischen Ende der Kapillare injiziert und der Einfluß der Höhe der angelegten Spannung auf die Trennleistung untersucht. In Abb. 47 sind die Elektropherogramme dargestellt, die mit Spannungen von 15, 10 bzw. 7,5 kV und 10 mM CE-Puffer erhalten wurden.

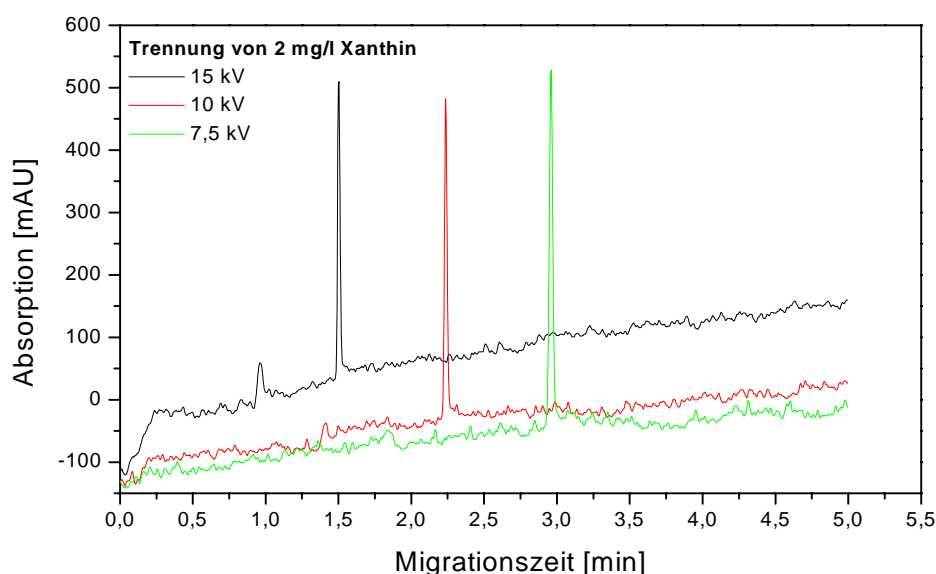


Abb. 47: Einfluß der Hochspannung; 2mg/l Xanthin; 10 mM CE-Puffer pH 9,2; Detektion: 280 nm

Die effektive Mobilität des Xanthins μ_{eff} nahm mit ansteigender Spannung durch die resultierende Erhöhung des elektroosmotischen Flusses zu (Tab. 21). Neben einer verkürzten Analysendauer verringerte sich ebenfalls die Breite der Peaks auf halber Höhe. Über die Temperierung der Kapillare konnte eine Bandenverbreiterung aufgrund der vermehrt entstehenden Jouleschen Wärme unterbunden werden. Die beobachtete Abnahme der Peakhöhen stand dabei nicht mit der Potentialerhöhung in Zusammenhang, sondern resultierte aus einer erhöhten Grundlinie (s. Abb. 47), die sich im Verlauf der Messungen zu geringeren Werten verschob und somit zu größeren Peakhöhen führte. Zusammenfassend betrachtet wurde die Qualität der Trennleistung daher mit größeren Feldstärken verbessert.

Potential [kV]	Migrationszeit [s]	Peakhöhe [mAU]	$w_{1/2}$ [s]	μ_{eff} [cm ² /V·s]
15	90,2	475	1,2	$3,991 \cdot 10^{-4}$
10	133,6	562	1,2	$4,042 \cdot 10^{-4}$
7,5	177,2	622	1,4	$4,064 \cdot 10^{-4}$

Tab. 21: Einfluß der angelegten Hochspannung auf Xanthin-Migrationszeit, Peakhöhe und -breite ($w_{1/2}$ = Peakbreite auf halber Peakhöhe) sowie auf die effektive Mobilität

Zur Trennung von Xanthin wurde daher für nachfolgende Untersuchungen eine Hochspannung von 15 kV ($E = 0,5$ kV/cm) angelegt.

3.3.1.3. Einfluß der Probenzusammensetzung

Obwohl die injizierte Probe nur einen sehr kleinen Anteil (< 1%) am Gesamtvolumen in der Kapillare einnimmt, übt die Probenmatrix in der CE einen sehr großen Einfluß auf die Trennung, die Quantifizierung und die Reproduzierbarkeit aus. Diese Matrixeffekte können aus einem Unterschied der Ionenstärke innerhalb der Kapillare resultieren, durch den sich der Stromfluß und damit der EOF verändert. Eine Modifizierung der Geschwindigkeit des elektroosmotischen Flusses hat wiederum Konsequenzen für die Migration der Analyte, die Bandenbreite und letztendlich für die Qualität der Trennung allgemein. Darüber hinaus kann die Matrix auch durch Wechselwirkungen mit der Kapillaroberfläche die Trennleistung beeinflussen.

Die bisherigen Untersuchungen wurden mit wäßrigen Xanthin-Standards durchgeführt, so daß keine Beeinträchtigung der Trennung durch Matrixeffekte auftreten konnte. In der Regel handelt es sich jedoch gerade bei Fermentationsproben um sehr komplexe Lösungen, die aus einer Vielzahl verschiedener Substanzen bestehen und somit eine Beeinflussung der Separation durch die Matrix nicht länger ausgeschlossen werden konnte.

Da im Gegensatz zu den Messungen im FIA-System für die CE-Untersuchungen kein HDF-Medium zur Verfügung stand, wurden die Xanthin-Standards in einer aus den vier Hauptkomponenten des Mediums (siehe Tab. 19) bestehenden Lösung angesetzt (*simuliertes Medium*).

Das simulierte Medium enthält:

- 27,5 g/l Glucose
- 13,3 g/l KH_2PO_4
- 1,7 g/l Zitronensäure
- 1,2 g/l MgSO_4

und wurde mit 1 M NaOH auf pH 7,6 eingestellt

In Abb. 48 sind die Elektropherogramme für die Analyse des reinen *simulierten* Mediums (rot) bzw. eines in diesem angesetzten 2 mg/l Xanthin-Standards (schwarz) dargestellt.

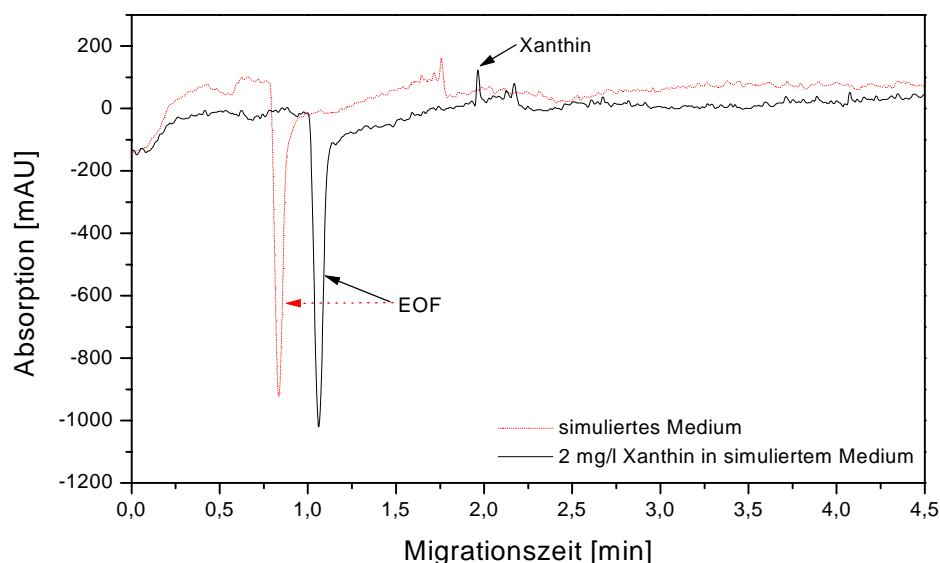


Abb.48: Einfluß der Probenmatrix auf die Xanthin-Detektion; 10 mM CE-Puffer pH 9,2; 15 kV

Wie deutlich zu erkennen, wurde die Trennleistung eindeutig von der Probenmatrix beeinflusst. Allein durch den KH_2PO_4 -Anteil wurde die Ionenstärke der Probe im Vergleich zum CE-Puffer um das Zehnfache angehoben. Aufgrund dieses Ionenüberschusses wurde die effektive Feldstärke in der Probe reduziert, dadurch verlangsamte sich die Migration der Probenionen und die Fokussierung der Analyt-Zonen wurde verhindert. Ein weiterer Effekt der erhöhten Leitfähigkeit der Probe und der damit herabgesetzten Migrationsgeschwindigkeit führte zur Ausbildung der in Abb. 48 gezeigten negativen Peaks. Nach dem *Kohlrausch-Gesetz* (Kap. 3.3.2.2) wird eine einheitliche Leitfähigkeit über den gesamten Bereich der Trennstrecke gefordert. Da die Leitfähigkeit der Probenzone größer als die des Trennpuffers war, kam es bei der Injektion zu einer Verdünnung der Probe, die in einem negativen Peak resultierte. Da diese Verdünnung zu einer quasi-stationären Phase führte, die keine elektrophoretische Mobilität besaß und lediglich über den EOF transportiert wurde, diente dieser Peak zur Bestimmung der elektroosmotischen Fließgeschwindigkeit (Macka *et al.*, 1997). Im Elektropherogramm des Mediums folgte dem EOF-Peak ein kleiner positiver Peak, der jedoch nicht weiter identifiziert wurde. Eine Xanthin-Konzentration von 2 mg/l konnte in dieser Matrix detektiert werden (schwarzes Elektropherogramm), jedoch reduzierte sich die Peakhöhe im Vergleich zur rein wässrigen Xanthin-Lösung um 96% auf 54 mAU und die Migrationszeit verlängerte sich von 90,2 s auf 100,8 s. Die zeitliche Verschiebung der beiden oben gezeigten Analysen, die gut am EOF-Peak zu erkennen war, stand in keinem Zusammenhang mit der Probenzusammensetzung, sondern war darauf zurückzuführen, daß die Kapillare zwischen den einzelnen Läufen nicht ausreichend gespült wurde. Spülschritte von jeweils 1 min mit 0,1 M NaOH, H_2O dest. und CE-Puffer erwiesen sich als zu kurz, um adsorbierte Substanzen von der Kapillaroberfläche zu entfernen und einen reproduzierbaren EOF zu gewährleisten. Durch eine Erweiterung der jeweiligen Spülschritte auf zwei Minuten konnte dieses Phänomen jedoch aufgehoben und stabile Migrationszeiten erreicht werden.

Da die hohe Ionenstärke der Probenmatrix das Xanthin-Signal zu einem großen Anteil unterdrückte, wurde das Medium im Anschluß 1:5 mit H_2O dest. verdünnt. Zwei in dieser verdünnten Matrix angesetzte Xanthin-Standards (0,5 und 1 mg/l) wurden anschließend analysiert.

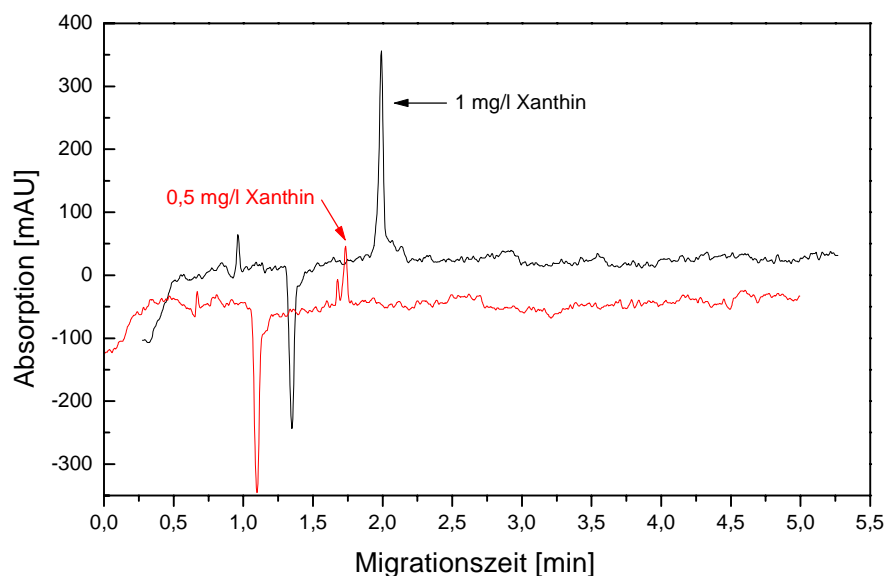


Abb. 49: Xanthin-Trennung in verdünntem Medium (1:5); 10 mM CE-Puffer pH 9,2; 15 kV

Die Verdünnung des simulierten Mediums führte zu einer deutlichen Verbesserung der Trennqualität (Abb. 49). Unter diesen Bedingungen wurde für 1 mg/l Xanthin (schwarz) mit einer Höhe von 307 mAU ein Peak erhalten, der gegenüber dem in unverdünntem Medium detektierten 2 mg/l Xanthin-Signal um den Faktor 5,7 vergrößert war. Auch eine Analyt-Konzentration von 0,5 mg/l (rotes Elektropherogramm) war mit einer Peakhöhe von 86 mAU noch meßbar. Die Migrationszeit blieb bei dieser Untersuchungsreihe mit 103/104 s im Bereich der in unverdünntem Medium durchgeführten CE-Trennungen. Der scheinbare Widerspruch, zwischen dem in Gleichung 12 formulierten Zusammenhang, daß das Zeta-Potential mit einer Erhöhung der Elektrolyt-Ionenstärke abnimmt, der EOF sich damit verringert und der Beobachtung, daß sich die Xanthin-Migration bei einer Verdünnung des Mediums um einige Sekunden verlangsamt, war auf die Verwendung einer neuen möglicherweise noch nicht ausreichend konditionierten Kapillare zurückzuführen.

Zusammenfassend erwies sich die Kapillarelektrophorese mit *on-column* UV-Absorptionsdetektion prinzipiell zur Xanthin-Bestimmung in Fermentationsproben geeignet. Um eine Detektion im relevanten Konzentrationsbereich (1 bis 50 mg/l) zu gewährleisten, war jedoch eine 1:5 Verdünnung des Mediums vor der Injektion notwendig. Da für die CE-Analytik keine Fermentationsproben zur Verfügung standen, war es nicht möglich neben dem mit Xanthin dotiertem Medium die von den

E. coli-Zellen ausgeschleuste Nukleobase auch in Realproben zu bestimmen. Da von den Zellen im Verlauf einer Kultivierung noch weitere Substanzen (z. B. Metabolite, Proteine) in das Medium sekretiert werden, könnte sich eine CE-Analyse dieser Proben als noch komplexer erweisen und möglicherweise eine aufwendigere *off-line* Probenvorbehandlung erfordern.

3.3.2. Indirekte LIF-Detektion

3.3.2.1 Grundlagen

Die Detektion über Laser-induzierte Fluoreszenz stellt die empfindlichste optische Nachweismethode dar, die der Kapillarelektrophorese zur Verfügung steht. Da sie im Gegensatz zur UV-Absorption nicht streng von der Schichtdicke abhängig ist, konnten beeindruckende Detektionslimits im Yoctomol-Bereich (10^{-24} mol; Chen *et al.*, 1994) bis zu einzelnen Enzymmolekülen (Xue und Yeung, 1995) erreicht werden. Bei dieser Nachweismethode absorbiert das Analytmolekül ein Photon und geht so in einen elektronisch angeregten Zustand über. Durch die im Vergleich zur Anregung zu einer höheren Wellenlänge verschobene Emission eines Photons kehrt der Analyt anschließend wieder in den Grundzustand zurück. Die Effizienz der LIF-Detektion wird daher hauptsächlich durch das verwendete Fluorophor bestimmt. Dieses sollte sowohl ein hohes Absorptionsvermögen als auch eine gute Fluoreszenz-Quantenausbeute bei der anregenden Wellenlänge aufweisen. Ein weiterer wichtiger Punkt ist die Photostabilität des Fluorophors, die im allgemeinen als die durchschnittliche Anzahl der Anregungs/Emissions-Cyclen definiert ist, die das Molekül bis zu seiner Deaktivierung durchlaufen kann.

Der Nachteil dieser Detektionsmethode ist, daß viele Analyte keine natürliche Fluoreszenzaktivität aufweisen und so der Trennung vor- oder nachgeschaltete Derivatisierungsreaktionen notwendig werden. Eine Alternative dazu bietet der indirekte LIF-Detektionsmodus. Hierbei wird dem zur Trennung verwendeten Elektrolyten ein Fluorophor zugesetzt, durch das ein hohes Fluoreszenz-Grundsignal erzeugt wird. Aufgrund der Verdrängung von fluoreszierenden Ionen des Puffers durch Probenionen während des Trennvorganges verringert sich das Hintergrundsignal und es kommt zur Ausbildung eines negativen Peaks (s. Kap. 2.2.9.2). Dieser Austausch erfolgt unter der Aufrechterhaltung der Elektroneutralität gemäß den effektiven Ladungsdichten von Probenionen und Fluorophor. Um eine möglichst

hohe Sensitivität für den Nachweis zu erzielen, sollte das Fluorophor neben den drei bereits zuvor genannten Bedingungen (Absorption, Quantenausbeute, Stabilität) keinen störenden Einfluß auf die eigentliche Trennung - keine Wechselwirkungen mit dem Analyt oder der Kapillaroberfläche - haben. Darüber hinaus sollte das Molekül zum Erreichen einer optimalen Austauschrate TR (*transfer ratio*) einfach geladen sein. Die Austauschrate ist definiert als die Anzahl der Fluorophor-Moleküle, die durch ein Analyt-Molekül verdrängt werden. Die Empfindlichkeit der indirekten LIF-Detektion wird dabei auch von der Stabilität des Grundsignals DR (*dynamic reserve* oder Signal/Rausch-Verhältnis) beeinflusst. Da das Analyt-Signal aus der Differenz zweier hoher Signale gebildet wird, ist zur Detektion geringer Probenkonzentrationen eine stabile Grundlinie unerlässlich. Der dritte Parameter, der einen Effekt auf die Sensitivität ausübt, ist die dem Puffer zugesetzte Fluorophor-Konzentration C_F . Im allgemeinen nimmt die Empfindlichkeit der indirekten Detektion mit abnehmender Fluorophor-Konzentration zu, da so prozentual betrachtet mehr Moleküle von einer gegebenen Anzahl Analytmoleküle verdrängt werden. Jedoch verschiebt sich bei kleineren Konzentrationen auch das Signal/Rausch-Verhältnis der Grundlinie zu einem ungünstigeren Wert, so daß zur Erreichung eines möglichst geringen Detektionslimits die zugesetzte Menge der fluoreszierenden Substanz nicht beliebig klein gewählt werden kann. Das Detektionslimit C_{lim} ist über die folgende Gleichung 16 mathematisch mit den drei Parametern verknüpft (Yeung und Kuhr, 1991):

$$C_{lim} = \frac{C_F}{(DR \cdot TR)} \quad (16)$$

3.3.2.2. Peakspektrum

Es ist bekannt, daß die Kapillarelektrophorese mit UV-Absorptionsdetektion in vielen Fällen nicht nur zu Signalen führt, die den einzelnen Probenkomponenten zugeordnet werden können, sondern es wurden noch weitere analyt-unspezifische Peaks beobachtet. Diese Signale treten auch im indirekten Detektionsmodus (UV und LIF) auf, wo sie die Auswertung der komplexen Elektropherogramme zusätzlich erschweren (Beckers, 1994). Analyt-Peaks treten bei einer indirekten LIF-Detektion aus folgenden Gründen auf:

1. Die Gegenwart einer fluoreszierenden Substanz innerhalb der injizierten Probe führt zu einem normalen (positiven) Peak
2. Die Gegenwart einer nicht fluoreszierenden Probenkomponente führt zu einer Verdrängung der fluoreszierenden Pufferionen und damit zu einem indirekten (negativen) Peak

Darüber hinaus werden analyt-unspezifische Signale, die allgemein als Systempeaks bezeichnet werden, beobachtet. Ihre Entstehung lässt sich auf zwei Ursachen zurückführen. Beide Erklärungsansätze basieren auf dem Prinzip der Isotachophorese (ITP), die neben der CZE eine weitere Unterart der Kapillarelektrophorese bildet. Die Probe wird hierbei zwischen zwei Elektrolytlösungen mit unterschiedlicher Ionenbeweglichkeit aufgegeben, wobei die Mobilitäten der Probenionen zwischen denen des Leit- und Folgeelektrolyten liegen müssen. Wird ein elektrisches Feld angelegt, ordnen sich die Probenionen entsprechend ihrer Mobilität zwischen den beiden Puffersystemen an (ITP-Fokussierung). Nach der Trennung der Analyte aufgrund ihrer Mobilitäten, werden sie mit einer festgesetzten Geschwindigkeit, die durch den Leitelektrolyten bestimmt wird, durch die Kapillare transportiert. Die ITP wird heute weniger als Trennverfahren, sondern viel mehr zur *on-line* Aufkonzentrierung der Probe eingesetzt. Durch eine verminderte Leitfähigkeit innerhalb der Probenzone im Vergleich zum Elektrolyten entsteht dort durch den erhöhten Widerstand eine größere Feldstärke. Die Mobilität der Analyte wird hierdurch in bezug auf die Pufferionen erhöht und die Probenbestandteile akkumulieren sich an der Grenzfläche zum Elektrolyten aufgrund der dort wieder reduzierten Feldstärke. Die Aufkonzentrierung läuft fort bis sich die Leitfähigkeit der Probenzone der des Elektrolyten angeglichen hat und damit in beiden Bereichen identische Feldstärken vorliegen. Die geringere Leitfähigkeit führt somit bei der Injektion zu einer Aufkonzentrierung der Probe, die über das *Kohlrausche Gesetz* (Gl. 17) erklärt werden kann, das eine einheitliche Leitfähigkeit über den gesamten Bereich der Trennstrecke fordert.

$$\omega(x) = \sum \frac{c_i(x) \cdot z_i}{|\mu_i|} = \text{konst}(x) \quad (17)$$

Dieses Gesetz gilt sowohl für starke mono- und multivalente als auch für schwache monovalente Elektrolyte. Die Summierung wird dabei über alle an einem gegebenen

Punkt x vorliegenden Konzentrationen c aller Substanzen i mit der Ladung z und Mobilität μ entlang des Migrationsweges durchgeführt. Die *Kohlrausch-Funktion* ω muß an jedem Punkt dieser Strecke einen identischen Wert aufweisen.

Bei einer indirekten Detektion kann daher durch die Injektion einer Probe mit einer vom Elektrolyten abweichenden Leitfähigkeit ein Signal verursacht werden. Die an der Schnittstelle der beiden Zonen stattfindende Aufkonzentrierung oder Verdünnung der Probe stellt eine stationäre Phase dar, da sie keine elektrophoretische Mobilität aufweist. Der Transport der Zone zum Detektor erfolgt ausschließlich über den elektroosmotischen Fluß, daher wird dieser in der Regel aus den Migrationszeiten der entsprechenden Signale bestimmt (Macka *et al.*, 1997). Da der Entstehung dieses Peaks keine Verdrängung des fluoreszierenden Pufferions durch den Analyten zu Grunde liegt, handelt es sich um einen Systempeak. Weitere analyt-un-spezifische Signale entstehen nach einem von Macka *et al.* (1997) publizierten Modell ebenfalls aufgrund von Mobilitätsunterschieden zwischen Puffer- und Proben-ionen. Voraussetzung für die Anwendbarkeit des Modells und damit für Ausbildung eines Systempeaks ist ein *Drei-Ionen-System*, das neben dem Fluorophor und seinem Gegenion noch mindestens ein weiteres Pufferion aufweist. Das Prinzip dieser auch als *vacancy peaks* (Freistellenpeaks) bezeichneten Signale ist in den Abbildungen 50 und 51 dargestellt:

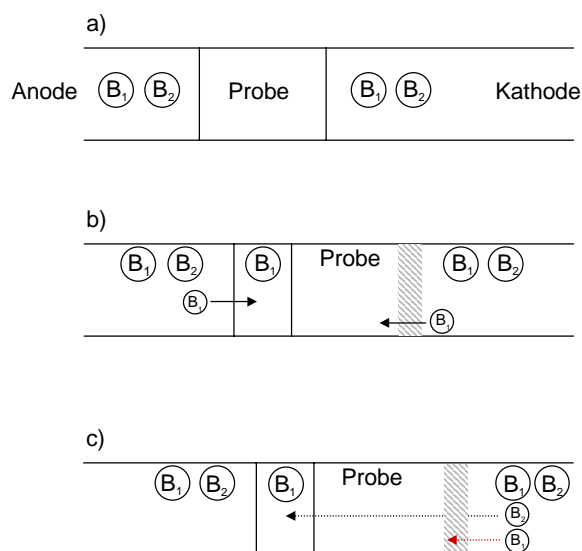


Abb. 50: $\mu_{B2} < \mu_{B1} < \mu_P$ a: Ausgangssituation
b: Anreicherung u. Ausbildung einer B_1 -Zone
c: Verbreiterung der Probenzone

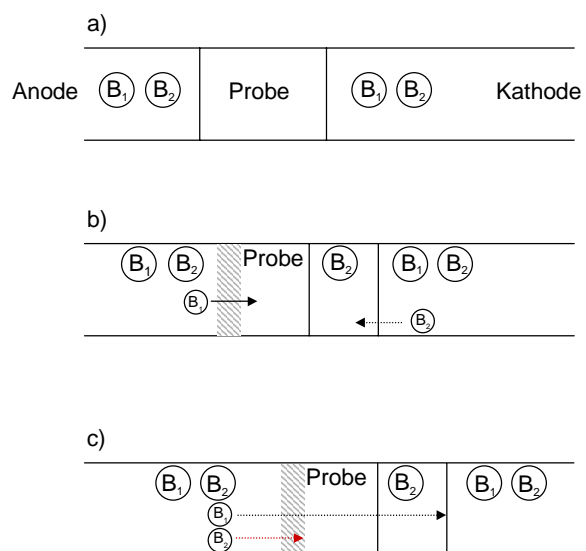


Abb. 51: $\mu_P < \mu_{B2} < \mu_{B3}$ a: Ausgangssituation
b: Anreicherung u. Ausbildung einer B_2 -Zone
c: Verbreiterung der Probenzone

In Abb. 50 ist die prinzipielle Entstehung eines Systempeaks erklärt, wenn sich die Mobilitäten der beteiligten Ionen in der Reihenfolge $\mu_{B2} < \mu_{B1} < \mu_P$ (B_1/B_2 : Pufferionen; P: Probe) verhalten. Nach der Injektion der Probe (Abb. 50a) und Anlegen eines elektrischen Feldes verändert sich das Muster der Zonen. Aufgrund der größeren Mobilität übernimmt die Probe bei der Ausbildung eines isotachophoretischen Systems die Rolle des Leitelektrolyten. Hinter dem Analyten bildet sich eine Zone aus, in der das Pufferion B_1 aufgrund seiner größeren Beweglichkeit im Vergleich zu B_2 praktisch separat vorliegt. Die Schnittstelle der B_1 /Proben-Zone stellt dabei eine isotachophoretische Grenze dar, die von B_1 nicht überschritten werden kann (Abb. 50b). Die Entstehung einer reinen B_1 -Bande geht mit der Tatsache einher, daß hier das zweite Pufferion B_2 fehlt und es sich bei dieser Zone somit auch um eine B_2 -Fehlstelle (*vacancy*) handelt. Gleichzeitig kommt es zu einer Verbreiterung der Probenbande durch Elektrodispersion, da die Probe schneller als beide Pufferionen migriert. Zum großen Teil dringt jedoch B_2 aufgrund der geringsten Beweglichkeit unter den beteiligten Ionen in die Probenzone ein. In Abbildung 50c ist die Situation, wie sie nach weiterer Elektromigration vorliegt, dargestellt. B_2 durchwandert das gesamte System, während die Probenzone durch das Eindringen von B_1 nochmals verbreitert wird. Hieraus resultiert die Entstehung von zwei getrennt voneinander wandernden Banden: einer Probenzone, in der die Konzentrationen der Pufferionen aufgrund des Austauschprozesses durch den Analyten modifiziert sind, wobei die Probe bevorzugt B_1 verdrängt, dessen Mobilität der des Analyten am ähnlichsten ist. Die zweite Zone wird vom B_1 -Ion selbst gebildet. In dieser Bande liegt keine Probe und B_2 nur in reduzierter Konzentration vor. Durch diese Zone wird ein Systempeak produziert, der auch als B_2 -Freistelle bezeichnet werden kann. Handelt es sich bei B_1 um das Fluorophor entsteht ein positiver Systempeak, besitzt dagegen ein nicht fluoreszierendes Pufferion eine höhere Mobilität, bildet sich durch das Fehlen des Fluorophors in dieser Zone ein Systempeak in negativer Richtung aus.

In den Abbildungen 51a-c sind die analogen Situationen gezeigt, für den Fall, daß die Mobilitäten in umgekehrter Reihenfolge ($\mu_P < \mu_{B2} < \mu_{B1}$) vorliegen. Die Probe stellt hier aufgrund der geringsten Mobilität den Folgeelektrolyten in dem transienten isotachophoretischen System dar, das sich vor dieser Zone ausbildet. Durch die verringerte Beweglichkeit im Vergleich zu B_1 akkumuliert B_2 vor der Probenzone, die isotachophoretische Proben/ B_2 -Grenze kann B_2 dabei jedoch nicht durchdringen (Abb. 51b). Bei fortschreitender Elektromigration wird die Probenbande aufgrund der größeren

Pufferionen-Mobilitäten verbreitert (Abb. 51c). Auch in diesem Fall kommt es wieder zur Ausbildung von zwei Zonen, die jedoch aufgrund der reziproken Mobilitätsreihenfolge der beteiligten Ionen im Vergleich zu Abbildung 50 auch in umgekehrter Abfolge migrieren. Der Detektor wird zunächst von der B_2 -Zone erreicht, die keine Probe und eine herabgesetzte B_1 -Konzentration aufweist und somit zu einem Systempeak führt. Auch hier hängt die Orientierung des Signals jeweils wieder davon ab, ob es sich bei B_2 um das Fluorophor (positiver Peak) oder um ein weiteres Pufferion (negativer Peak) handelt. Dem Systempeak nachfolgend migriert anschließend die Probenzone, in der aufgrund der näher beieinander liegenden Beweglichkeiten vorzugsweise B_2 durch den Analyten verdrängt wird.

Für den dritten möglichen Fall, daß die Mobilität der Probe zwischen denen der beiden Pufferionen B_1 und B_2 liegt, lassen sich keine allgemeingültigen Vorhersagen über die Entstehung und Orientierung von Freistellen-Systempeaks treffen. In der Regel ergibt sich für die jeweils individuell zu betrachtenden Fälle eine der beiden oben beschriebenen Endkonfigurationen (Macka *et al.*, 1997).

Neben den Analytsignalen werden daher bei einer indirekten Detektion auch analytunspezifische elektroosmotische *Kohlrausch*- und Freistellen-Peaks beobachtet.

3.3.2.3. Indirekte LIF-Detektion von Xanthin

Für den indirekten Nachweis von Xanthin über eine Fluoreszenz-Messung wurden zunächst die Bedingungen aus der direkten UV-Absorptionsdetektion übernommen. Die Probe wurde über eine Druckinjektion (4 s) in den 10 mM CE-Puffer pH 9,2, der zur Erzeugung des Grundsignals 5 μ M Fluorescein enthielt, eingebracht. In Abbildung 52 sind zwei Elektropherogramme gezeigt, die bei Injektion von reinem Wasser bzw. eines in Wasser angesetzten Xanthin-Standards (10 mg/l) erhalten wurden. Bereits die reine Wasser-Analyse belegte die Komplexität eines im indirekten Detektionsmodus aufgenommenen Elektropherogramms, das drei negative Signale aufwies.

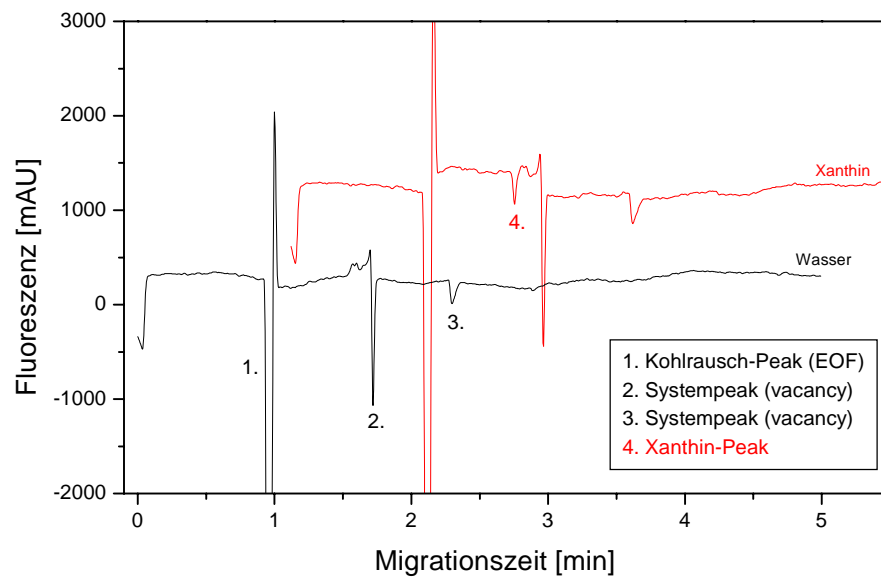


Abb. 52: Charakteristische Elektropherogramme für die indirekte LIF-Detektion von reinem Wasser und 10 mg/l Xanthin; 10 mM CE-Puffer pH 9,2; 5 μ M Fluorescein; 15 kV

Der erste Peak konnte auf einen nach dem *Kohlrausch-Gesetz* geforderten Leitfähigkeitsausgleich zwischen Elektrolyt und Probe zurückgeführt werden, durch den die Probe aufkonzentriert wurde. Dieses Signal wurde wie unter 3.3.2.2 erläutert zur Bestimmung der Geschwindigkeit des elektroosmotischen Flusses herangezogen. Nach der Detektion des großen negativen EOF-Signals stieg die Fluoreszenz wieder sprunghaft an, so daß es zu einem kurzen Überschwingen kam, das sich in dem direkt nachfolgenden positiven Signal äußerte, bevor sich die Fluoreszenz wieder auf dem Niveau der Grundlinie stabilisierte. Das zweite negative Signal stellte ebenfalls einen Systempeak dar, allerdings handelte es sich hierbei um einen Freistellen-Peak. Da Fluorescein bei einem pH-Wert von 9,2 zweifach negativ geladen vorlag (Huang und Whang, 1998), wies es eine geringere Mobilität als alle anderen CE-Pufferanionen auf, so daß es sich bei diesem Signal wie in Abb. 50 dargestellt um die Formierung einer Pufferion-Zone mit reduzierter Fluorophor-Konzentration handelte, die somit bei ihrer Detektion zu einem negativen Signal führte. Poppe (1992) bezeichnete Systempeaks als *Eigenzonen* und beobachtete, daß man mit einem n Komponenten enthaltenden elektrophoretischem System n-1 bzw. bei Ausklammerung eines elektroosmotischen *Kohlrausch-Peaks* n-2 Freistellen-Peaks erhält. Da es sich bei dem vorliegenden Elektrolyten mit Borat, Carbonat, Fluorescein und Natrium als gemeinsames Gegenion, um ein Vier-Komponenten-System

handelte, entsprach das dritte und kleinste negative Signal (2,29 min) ebenfalls einem Systempeak, der auf die Ausbildung einer zweiten Pufferion-Zone mit reduzierter Fluorophor-Konzentration zurückzuführen war.

Die Injektion des in Wasser angesetzten Xanthin-Standards (Abb. 52, rotes Elektropherogramm) wies neben den drei identifizierten Systempeaks ein viertes negatives Signal auf (1,63 min), das aus dem Austausch des Fluoresceins gegen die Nukleobase resultierte. Aus der veränderten Zusammensetzung der Probe ergab sich jedoch nicht allein der indirekte Xanthin-Peak, sondern zusätzlich eine allgemeine Erhöhung aller auftretenden Peaks. Dies ist ein Phänomen, das häufig im indirekten Detektionsmodus beobachtet wird, doch bislang noch unverstanden bleibt (Beckers, 1994). Da Xanthin zwischen dem EOF- und dem ersten Systempeak migrierte, war die Mobilität des Analyten größer als die der Pufferionen. Dies lag auch in guter Übereinstimmung mit dem in Gleichung 4 formulierten Zusammenhang zwischen der elektrophoretischen Mobilität und dem Molekülradius. Bei gleicher Ladung zeigt ein Molekül mit dem kleineren Radius die größere Mobilität. Handelt es sich wie in diesem Fall bei den Molekülen um Anionen, mit einer dem EOF entgegen gerichteten Mobilität, migriert jedoch die größere Substanz schneller, da sie diesem eine kleinere Kraft entgegensetzt.

3.3.2.4 Einfluß der Fluorescein-Konzentration

Für den indirekten Detektionsmodus wurde der pH-Wert des CE-Puffers nicht verändert, da die Fluoreszenzaktivität des Fluoresceins mit steigendem pH zunimmt und bei Werten ≥ 9 einen konstanten Level erreicht (Huang und Whang, 1998). Untersucht wurde jedoch die Abhängigkeit der Xanthin-Peakhöhe von der dem Elektrolyten zugesetzten Fluorophorkonzentration. Abbildung 53 zeigt mit Fluorescein-Konzentrationen von 5, 10, 20 und 50 μM aufgezeichnete Elektropherogramme der Trennung eines wäßrigen Xanthin-Standards (10 mg/l). Deutlich zu erkennen war innerhalb dieser Versuchsreihe, daß sich sowohl die Systempeaks (EOF- und Freistellen-Peaks) als auch der Xanthin-Peak mit zunehmender Fluorescein-Konzentration vergrößerten.

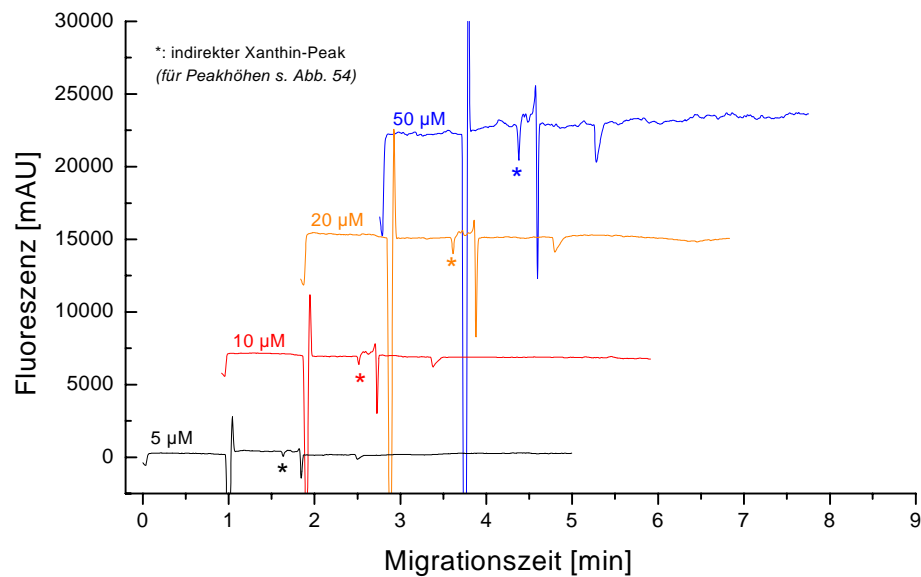


Abb. 53: Abhängigkeit des indirekten Xanthin-Signals von der Fluorescein-Konzentration (5 µM, 10 µM; 20 µM und 50 µM), 10 mM CE-Puffer, 4 s Druckinjektion, 10 mg/l Xanthin, 15 kV

Die Höhe des Analyt-Signals stieg dabei wie in Abb. 54 gezeigt linear an.

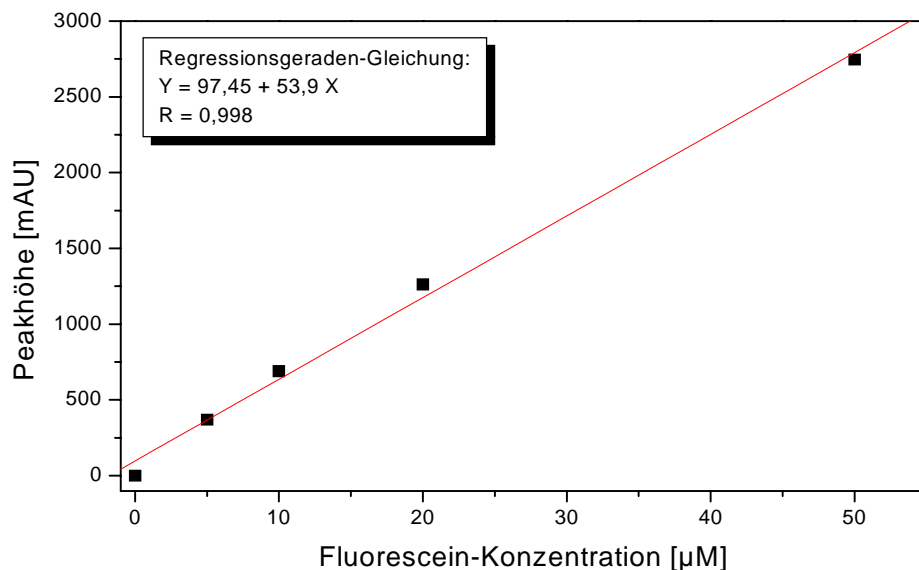


Abb. 54: Abhängigkeit des indirekten Xanthin-Signals von der Fluorescein-Konzentration, 10 mM CE-Puffer, 4 s Druckinjektion, 10 mg/l Xanthin, 15 kV

Die Sensitivität des Nachweises erhöhte sich nicht – wie in Gleichung 16 formuliert – mit abnehmender Fluorescein-Konzentration. Aufgrund des großen Analyt-Überschusses blieb der prozentuale Anteil der durch Xanthin verdrängten Moleküle bei

allen gewählten Fluorescein-Konzentrationen gleich, so daß keine Empfindlichkeits-erhöhung aus der Reduzierung der dem Elektrolyten zugesetzten Fluorophormenge resultierte. Bei den gewählten Konzentrationen wurde die erhöhte Sensitivität durch eine verbesserte Stabilität des Grundsignals mit ansteigender Fluorescein-Konzentration hervorgerufen, wodurch das Signal/Rausch-Verhältnis positiv beeinflusst wurde und somit zu größerer Empfindlichkeit führte (s. Gl. 16). Auch Kuhr (1999) beobachtete mit Fluorescein als signal-erzeugender Substanz eine verbesserte Empfindlichkeit der indirekten Detektion mit ansteigender Fluorophor-Konzentration. Unter den gewählten Bedingungen wurde für die Bestimmung von Xanthin über indirekte LIF-Detektion eine Empfindlichkeit von 53,9 mAU/ μ M Fluorescein erreicht.

Mit ansteigender Fluorescein-Konzentration wurde jedoch auch eine Abnahme der effektiven Xanthin-Mobilität und damit verlängerte Migrationszeiten beobachtet (Tab. 22). Durch den Fluorophor-Zusatz wurde die Ionenstärke des Elektrolyten erhöht und damit das ζ -Potential in der diffusen Stern-Grenzschicht verringert (Huang und Whang, 1998). Diese Potentialveränderung wiederum führte zu einer Herabsetzung der Geschwindigkeit des elektroosmotischen Flusses, woraus die geringere effektive Mobilität des Xanthins und die verlängerte Gesamtanalysendauer resultierte.

Fluorescein-Konz.	Migrationszeit	μ_{eff} [$\text{cm}^2/\text{V}\cdot\text{s}$]
5 μ M	98,2 s	$4,684 \cdot 10^{-4}$
10 μ M	95,8 s	$4,802 \cdot 10^{-4}$
20 μ M	106,4 s	$4,323 \cdot 10^{-4}$
50 μ M	110,2 s	$4,174 \cdot 10^{-4}$

Tab. 22: Einfluß der Fluorescein-Konzentration auf die Migrationszeit und μ_{eff} des Xanthins

Wie in Tabelle 22 zusammengefaßt, wurden abnehmende Xanthin-Beweglichkeiten mit Zunahme der Fluorescein-Konzentration von 10 μ M auf 50 μ M beobachtet. Eine Erniedrigung der Mobilität war jedoch beim Zusatz von nur 5 μ M des Fluorophors im Vergleich zu einer mit der zweifachen Konzentration durchgeführten Trennung festzustellen. Dieser Effekt war auf die Reihenfolge der durchgeführten Untersuchungen zurückzuführen. Die Xanthin-Trennungen mit der geringsten dem CE-Puffer zugesetzten Fluorescein-Konzentration bildeten den Abschluß der Meßreihe,

so daß durch ein möglicherweise nicht ausreichendes Spülen der Kapillare zwischen den einzelnen Elektrolytwechseln, Fluorescein verschleppt und so die Xanthin-Mobilität trotz der nominell geringsten Konzentration verlangsamt wurde.

Da sich die Analysendauer mit ansteigender Fluorescein-Konzentration lediglich um 14 s verlängerte, die Peakhöhen aber einen linearen Anstieg aufwiesen, wurden weitere Experimente mit einem Fluorophor-Zusatz von 50 μM durchgeführt.

3.3.2.5 Elektrolyt-Konzentration

Neben dem Einfluß der Fluorescein-Konzentration wurde auch die Auswirkung der Elektrolyt-Ionenstärke auf das indirekte Xanthin-Signal untersucht. Der CE-Puffer wurde in drei verschiedenen Konzentrationen (2,5 mM, 5 mM und 10 mM) mit jeweils 50 μM Fluorescein angesetzt. In Tabelle 23 sind die Peakhöhen zusammengefaßt, die durch die Injektion eines Xanthin-Standards (10 mg/l in Wasser) mit dem jeweiligen Trennmedium erzielt wurden. Das höchste Xanthin-Signal wurde dabei mit einer Ionenstärke von 5 mM erzielt. Im Vergleich zu den Ergebnissen die mit einem 10 mM CE-Puffer erhalten wurden, bedeutete dies eine Vergrößerung der Peakhöhe um 78%. Bei einer weiteren Verringerung der Ionenstärke auf 2,5 mM nahm das Signal zwar wieder ab, blieb jedoch immer noch um 39% gegenüber der 10 mM-Messung erhöht.

Konzentration CE-Puffer	Peakhöhe [mAU]
2,5 mM	3817
5 mM	4881
10 mM	2747

Tab. 23: Einfluß der Elektrolytkonzentration auf das indirekte Xanthin-Signal

Nach Kuhr (1999) kann die Empfindlichkeit einer indirekten LIF-Detektion gesteigert werden, wenn der Elektrolyt ausschließlich aus dem Fluorophor und seinem Gegenion besteht. In Abb. 55 sind zwei Elektropherogramme dargestellt, die unter Verwendung einer 2 μM Fluorescein-Lösung in Wasser als Trennmedium aufgezeichnet wurden. Um eine maximale und konstante Fluoreszenz-Aktivität zu erhalten, wurde die Lösung durch Zugabe von NaOH auf einen pH-Wert von 9,2 eingestellt. Das

Elektropherogramm für die Analyse von reinem Wasser ist dabei als rote Linie dargestellt.

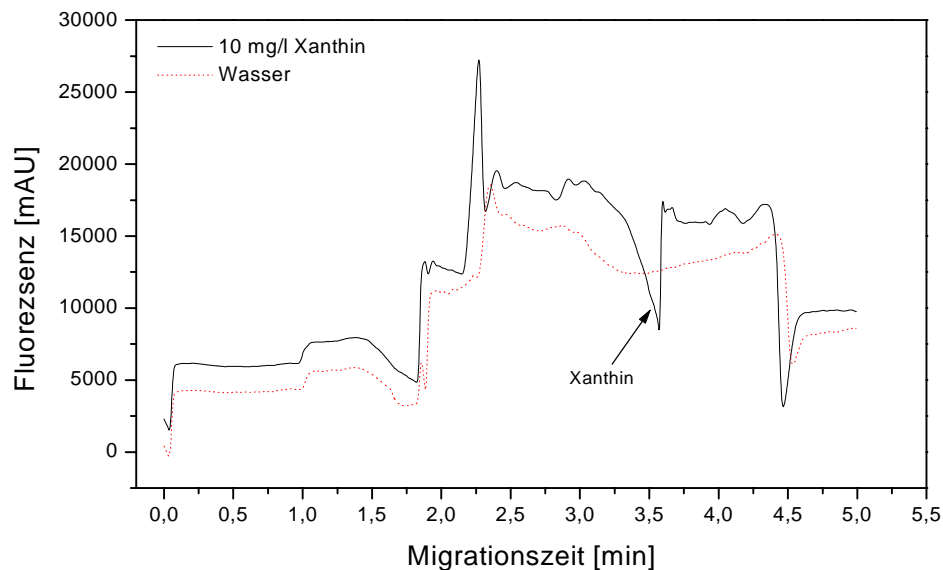


Abb. 55: Trennung von Xanthin unter Verwendung von 2 μM Fluorescein als Elektrolyt, 4 s Druckinjektion von 10 mg/l Xanthin, 20 kV

Deutlich zu erkennen war, daß aufgrund der nicht bzw. nur sehr unzureichend puffernden Wirkung des Elektrolyten der pH-Wert-Unterschied zur Probe nicht kompensiert werden konnte und sich daraus eine stufenartige Verschiebung der Fluoreszenz-Grundlinie ergab. Aufgrund des durch Fluorescein verursachten geringen Leitfähigkeitsunterschiedes entstand ein vergleichsweise kleiner negativer *Kohlrausch-EOF-Peak*. Obwohl mit Fluorescein und seinem Gegenion Natrium eigentlich nur ein *zwei-Ionen-System* vorlag und somit nach der Theorie von Poppe keine *vacancy Peaks* auftreten sollten (siehe S. 115), wurde im Elektropherogramm der Wasser-Analyse ein solcher Systempeak beobachtet. Bei Einsatz von Elektrolyten mit nur einem Anion und Kation kann die Rolle des zur Ausbildung eines Systempeaks nötigen dritten Ions bei niedrigen oder hohen pH-Werten von H^+ - bzw. OH^- -Ionen übernommen werden (Gross und Yeung, 1989; Beckers, 1994). Aufgrund der größeren Mobilität des einfach negativ geladenen OH^- im Vergleich zum Fluorescein, das bei diesem pH-Wert zwei Ladungen trug, handelte es sich bei dem zweiten auftretenden negativen Signal um einen Systempeak, der aus einer reduzierten Fluorescein-Konzentration innerhalb einer OH^- -Bande resultierte. Das zweite in Abb. 55 gezeigte Elektropherogramm (schwarz) stellt die Injektion eines in Wasser ange-

setzten Xanthin-Standards (10 mg/l) dar. Wie auch mit dem CE-Puffer als Trennmedium wurde eine generelle Vergrößerung aller Signale durch die veränderte Probenzusammensetzung herbeigeführt. Durch den Zusatz des Xanthins änderte sich das Leitfähigkeitsverhältnis zwischen Probe und Elektrolyt entscheidend. Aufgrund der nun größeren Leitfähigkeit der Probe wurde diese an der isotachophoretischen Grenze nicht aufkonzentriert, sondern verdünnt, so daß in diesem Fall ein positiver *Kohlrausch-EOF-Peak* entstand. Der negative Xanthin-Peak wies eine Höhe von 8360 mAU auf und war somit um 71% größer gegenüber dem mit optimierter Puffer- und Fluorescein-Konzentration aufgezeichnetem Signal trotz der mit 2 µM um den Faktor 25 reduzierten Fluorescein-Konzentration. Jedoch verbreiterte sich der indirekte Xanthin-Peak gleichzeitig auch von 6,6 s auf 28,8 s auf halber Peakhöhe. Aufgrund der höheren Leitfähigkeit der Probe und der somit im Vergleich zum Elektrolyten verminderten Feldstärke, wanderten die Xanthin-Moleküle im Konzentrationsmaximum langsamer als an den Flanken dieser Zone, was zu einem langsamen Anstieg und schnellem Abstieg (*frontender Peak*) des Signals führte.

Durch den Einsatz der in Wasser angesetzten Fluorescein-Lösung und der damit verbundenen Herabsetzung der Ionenstärke wurde die Sensitivität des Xanthin-Nachweises erhöht. Desbène *et al.* (1995) beobachteten, daß die Empfindlichkeit der indirekten LIF-Detektion im allgemeinen durch geringe Elektrolyt-Ionenstärken verbessert wird, daß diese jedoch auf der anderen Seite die Qualität der Trennung einschränken. Daher ist es nötig die Bedingungen so zu wählen, daß diese einen Kompromiß zwischen Empfindlichkeit und Trennleistung darstellen.

Die in diesem Kapitel beschriebenen Untersuchungen dienten nicht zur Optimierung der indirekten Xanthin-Detektion, sondern sollten lediglich zeigen, daß für diesen Analyten auch ohne Derivatisierung ein Fluoreszenz-Nachweis möglich war, um die wichtigste Voraussetzung für eine Übertragung der Trennung auf einen Mikrochip zu gewährleisten. Da sich eine UV-Absorptionsdetektion, wie in Kap. 1.6.2.2 geschildert, noch nicht mit analytischen Mikrosystemen kombinieren läßt, wurden mit dem kommerziellen CE-Gerät grundlegende Experimente zum Nachweis von Xanthin über indirekte LIF-Detektion mit dem Ziel durchgeführt, diesen Assay anschließend auf ein mikrofluides Kanalnetzwerk übertragen zu können, ohne daß an dieses weitere instrumentelle Anforderungen gestellt werden mußten.

3.4 Miniaturisierte Analysesysteme zur Bestimmung von Xanthin

3.4.1 Mikro-Kapillarelektrophorese

Zur Trennung und indirekten LIF-Detektion von Xanthin in einem mikrofluiden System (POCRE-1-Chip) wurde der in Abbildung 16 gezeigte Aufbau verwendet. Der Laserstrahl wurde in einem Abstand von 32,08 mm vom Injektionsbereich auf Kanal 2 fokussiert, so daß sich der Detektionspunkt genau vor der ersten Krümmung dieser Kapillare befand. Je nach der Verteilung der Moleküle über die Kanalbreite, benötigen sie zum Passieren von Krümmungen unterschiedlich viel Zeit. Analytmoleküle, die in Flußrichtung gesehen auf der rechten inneren Seite wandern, müssen zur Umrundung der Kurve einen wesentlich kürzeren Weg zurücklegen als Moleküle die auf der linken äußeren Seite migrieren (Culbertson *et al.*, 1998). Die unterschiedlichen Weglängen führen bei einer Detektion hinter der Kanalkrümmung zu einer Bandenverbreiterung und damit zu einer Beeinträchtigung der Trennqualität. Zur Vermeidung solcher Effekte, die auf geometrischen Eigenheiten des Chip-Designs beruhen, wurde vor der Krümmung in Kanal 2 detektiert. Um beim Sammeln der emittierten Fluoreszenz das durch das Rayleigh- und Raman-Streulicht verursachte Hintergrundsignal auszuschalten, wurde ein Bandpaßfilter (520 nm) in das Mikroskop-Detektionssystem integriert. Des weiteren wurde eine Lochblende verwendet, die das Sichtfeld des Mikroskop-Objektives auf einen kleinen Spot innerhalb von Kanal 2 beschränkte. Somit wurde eine Abschwächung der emittierten Fluoreszenz aufgrund von Randeffekten unterbunden, die aus einem über die Kanalbreite hinausgehenden Sichtfeld resultiert hätten.

Für erste Voruntersuchungen wurden die Bedingungen zur Trennung von Xanthin vom konventionellen CE-System (5 mM CE-Puffer, 50 µM Fluorescein) auf den POCRE-Chip übertragen. Jedoch zeigte sich sofort, daß dies so nicht möglich war, da sich zum einen die zur Verfügung stehenden Photomultiplier als zu sensitiv für Fluorescein-Konzentrationen oberhalb von 2 µM erwiesen und zum anderen mit einer Elektrolyt-Ionenstärke von nur 5 mM keine Trennung von Xanthin erreicht wurde. Der Einsatz höherer Fluorescein-Konzentrationen ließ sich auch über eine Reduzierung der Laserleistung (4,4 mW) nicht erzielen, da das Signal auch weiterhin außerhalb des linearen Bereiches blieb. Auf die Möglichkeit, die Detektion von Fluorescein auch oberhalb von 2 µM durch eine Modifizierung der fokussierenden

Optik zu realisieren, wurde verzichtet, da durch den Austausch der Linse eine zeit-
aufwendige Neu-Justierung des gesamten Systems erforderlich gewesen wäre. Wie
die Voruntersuchungen auch zeigten, konnte die Puffer-Konzentration nicht beliebig
klein gewählt werden. Zur Trennung von Xanthin im POCRE-Chip war eine Mindest-
konzentration von 10 mM nötig, mit geringeren Ionenstärken wurde kein Signal
beobachtet.

Die in Abbildung 56 gezeigte Xanthin-Trennung wurde aus diesen Gründen mit einer
CE-Puffer-Konzentration von 10 mM und einem Fluorescein-Zusatz von 1 μ M
durchgeführt. Das Elektropherogramm zeigte einige Abweichungen im Vergleich zu
den Trennungen mit einem konventionellen CE-Instrument, da die Probe nicht wie
zuvor in Wasser, sondern in CE-Puffer (ohne Fluorescein) angesetzt wurde. Da eine
Druckinjektion mit dem Mikrosystem nicht möglich war, wurde die Probe
elektrokinetisch wie unter 2.2.10.3 beschrieben mit Hilfe der *doppel-T*-Struktur
eingebracht, was einen weiteren Unterschied zum Testablauf am konventionellen
Gerät darstellte. Die anschließende Separation wurde mit einer Spannung von 5,1 kV
durchgeführt, woraus sich eine zu den vorherigen Untersuchungen (0,5 kV/cm)
vergleichbare Feldstärke von 0,52 kV/cm ergab.

Das in Abb. 56 dargestellte Puffer-Elektropherogramm wies im Gegensatz zu den in
Abb. 52 gezeigten Trennungen von in H₂O angesetzten Proben nur noch zwei
Signale auf. Aufgrund des geringen allein auf der Gegenwart von Fluorescein im
Elektrolyten beruhenden Leitfähigkeitsunterschiedes wurde unter diesen Be-
dingungen kein elektroosmotischer *Kohlrausch-Peak* beobachtet. Der positive etwa
nach 7 s migrierende Peak war auf die in der Probe enthaltenen Natrium-Ionen zu-
rückzuführen. Nach der von Kohlrausch definierten Gesetzmäßigkeit kam es zu einer
Anpassung der Leitfähigkeiten zwischen der Na⁺-Bande und dem Puffer durch die in
diesem enthaltenen Anionen. Auf diese Weise konnte das nicht-fluoreszierende
Natrium durch eine gleichzeitige Fluorescein-Anreicherung indirekt nachgewiesen
werden (*indirekter Kohlrausch-Peak*). Der große negative Peak resultierte wie schon
unter 3.3.2.2 erläutert aus den Mobilitätsunterschieden der einzelnen Pufferbestand-
teile (*vacancy peak*). Der dritte bei der Analyse von Wasser mit dem kommerziellen
System detektierte negative Peak trat in diesem Elektropherogramm aufgrund eines
identischen pH-Wertes zwischen Probe und Elektrolyt nicht auf.

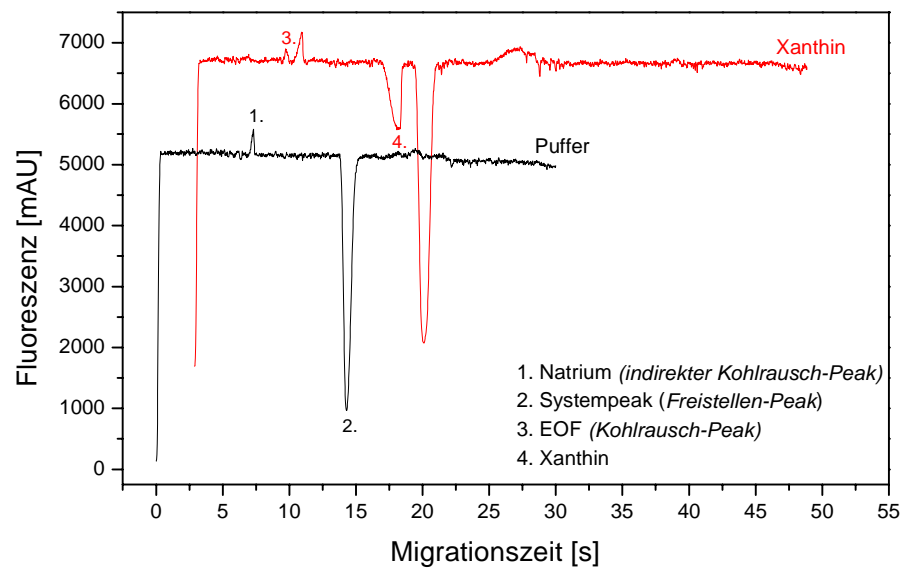


Abb. 56: Elektropherogramme für Puffer- und Xanthin-Injektion mit indirekter LIF-Detektion, 10 mM CE-Puffer, 1 μ M Fluorescein, 15 s Injektion, Separation: 5,1 kV

Die Injektion von 2 mM (348 mg/l) Xanthin in CE-Puffer gelöst führte zu dem roten in Abb. 56 dargestellten Peakspektrum. Ein zweiter negativer Peak, der auf der Verdrängung des Fluoresceins durch Xanthin beruhte, wurde nach 15,32 s detektiert. Die Injektion der Xanthin-Probe führte auch zur Ausbildung eines weiteren positiven Peaks (6,74 s), bei dem es sich um einen *Kohlrausch-EOF-Peak* handelte. Da die Probe eine höhere Leitfähigkeit und damit eine kleinere Feldstärke aufwies, wurde sie verdünnt, was sich in einem leichten Anstieg des Fluoreszenz-Signals bemerkbar machte.

3.4.1.1 Fluorescein-Konzentration

Der Einfluß der Fluorescein-Konzentration auf die Empfindlichkeit und die Qualität der Trennung wurde auch im Mikrosystem untersucht. Aufgrund der hohen Sensitivität des Photomultipliers konnte hier im Vergleich zum kommerziellen Gerät jedoch nur ein begrenzter Konzentrationsbereich berücksichtigt werden. In Abb. 57 sind drei Elektropherogramme dargestellt, die bei der Injektion einer 1 mM Xanthin-Lösung mit einem Fluorescein-Zusatz von 0,1 μ M, 1 μ M und 2 μ M zum CE-Puffer (10 mM) aufgezeichnet wurden. Ein Anstieg aller auftretenden Signale mit der Fluorescein-Konzentration war deutlich zu erkennen. Wie schon bei der entsprechenden Meßreihe mit der konventionellen CE sollten die Migrationszeiten auch

hier mit der Fluorescein-Konzentration zunehmen. Dies wurde bei einer Erhöhung der Fluorophor-Konzentration von 1 μM auf 2 μM beobachtet, die geringste effektive Mobilität wies Xanthin jedoch bei einem Zusatz von nur 0,1 μM auf. Die auf 9,92 s verlängerte Migrationszeit des indirekten Xanthin-Peaks war allerdings auf die Chronologie der durchgeführten Trennungen zurückzuführen. Im Gegensatz zur makro-CE wurde der Chip zwischen den einzelnen Analysen nicht gespült, so daß es zur Adsorption von Puffer- oder Probenkomponenten an der Kapillaroberfläche kam, durch die der elektroosmotische Fluß im Verlauf eines Meßtages verringert wurde. Da die Trennungen mit einem Zusatz von 0,1 μM Fluorescein zum Abschluß durchgeführt wurden, resultierte die geringe Mobilität aus einer Verlangsamung des EOFs aufgrund von Ablagerungen und wurde nicht durch die Veränderung der Pufferzusammensetzung verursacht.

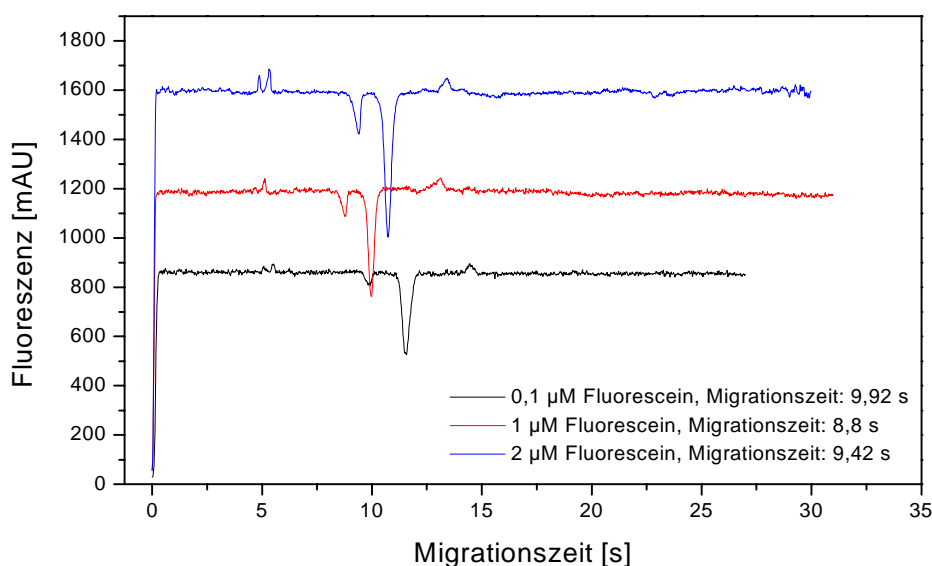


Abb. 57: Einfluß der Fluorescein-Konzentration auf die Qualität der Trennung, 1 mM Xanthin; Injektionsdauer: 15 s; Separations-Spannung: 5,1 kV

In Abb. 58 ist nochmals die Abhängigkeit des Xanthin-Signals von der dem Puffer zugesetzten Fluorescein-Konzentration dargestellt. Im Unterschied zum kommerziellen System (siehe Abb. 54) zeigte das Signal keinen linearen Verlauf über den gesamten untersuchten Konzentrationsbereich. Es stieg bei der kleinsten untersuchten Konzentration sehr stark an, zwischen 0,1 und 2 μM verringerte sich die Signalzunahme, zeigte jedoch in diesem Bereich eine mit dem kommerziellen System (53,9 mAU/ μM) nahezu identische Steigung von 55,3 mAU/ μM Fluorescein. Trotz der größten mit

einem Fluorescein-Zusatz von 2 μM erzielten Peakhöhe wurde für nachfolgende Analysen die Konzentration auf 1 μM abgesenkt, da somit gesichert werden konnte, daß das Fluoreszenz-Grundsignal stets im linearen Meßbereich des Photomultipliers lag. Mit einer Fluorescein-Konzentration von 2 μM bewegte sich das Signal am oberen Ende dieses Meßbereiches, so daß die Linearität nicht zu allen Zeitpunkten gewährleistet werden konnte.

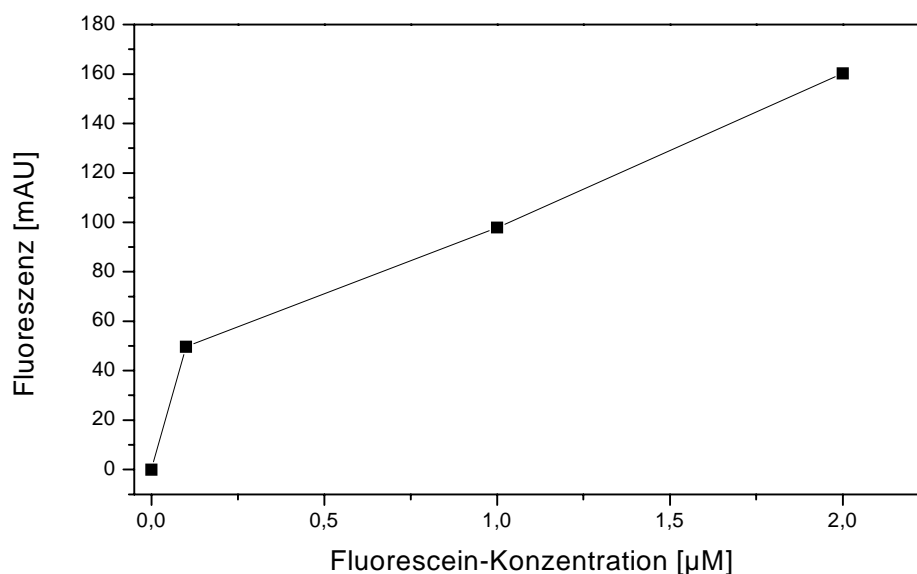


Abb. 58: Einfluß der Fluorescein-Konzentration auf die Xanthin-Peakhöhe

3.4.1.2 Separations-Spannung

Zur Trennung von Xanthin mittels einer miniaturisierten CE und indirekter Fluoreszenz-Detektion wurden vier verschiedene Spannungen zwischen den Reservoiren 2 und 5 angelegt. Über die beiden Seitenarme wurde eine 1 mM Xanthin-Lösung für 15 s mit einem Potential von 0,5 kV injiziert. Die vier CE-Läufe sind in der folgenden Abbildung 59 dargestellt. Alle Elektropherogramme zeigten eine Grundlinienauflösung zwischen Xanthin- und Systempeak. Wie bereits zu Beginn dieses Abschnitts erwähnt, erhöhte sich die EOF-Fließrate und die Migrationsgeschwindigkeit des Analyten, die Peakform wurde mit ansteigender Potentialdifferenz schmaler und schärfer (Tab. 24). Eine Bandenverbreiterung durch ein vermehrtes Auftreten von Joulescher Wärme wurde nicht beobachtet, da diese durch das günstige Breiten/Tiefen-Verhältnis (*aspect ratio*) der annähernd rechteckig geätzten Kanäle effektiv abgeführt wurde (Cifuentes und Poppe, 1995).

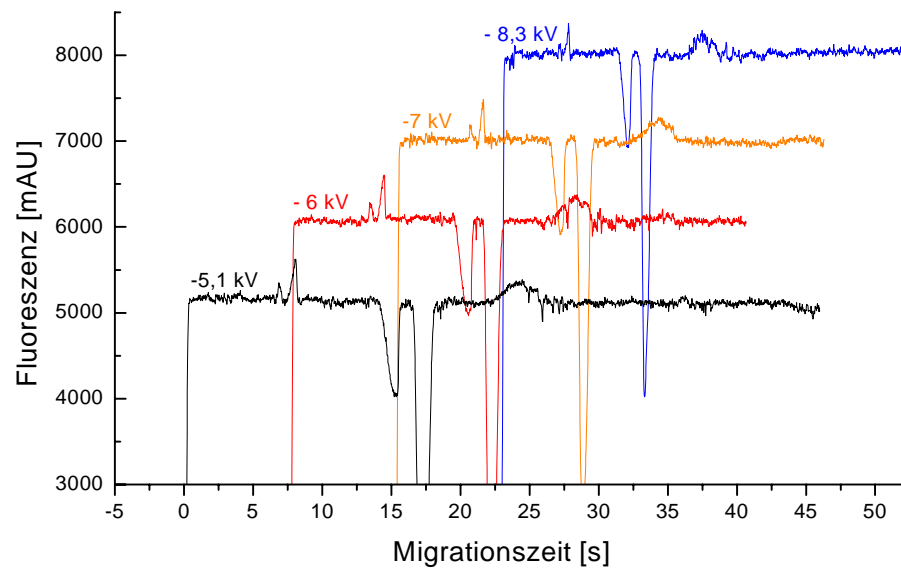


Abb. 59: Einfluß der Separations-Spannung auf die Xanthin-Trennung; 1 mM Xanthin, Injektionsdauer 15 s, Injektionspotential 0,5 kV

Im Gegensatz zu den Migrationszeiten und der Peakbreite in halber Höhe ($w_{1/2}$) änderte sich die Peakhöhe nicht mit einer ansteigenden Potentialdifferenz (Tab. 24).

Potential [kV]	Migrationszeit [s]	Peakhöhe [mAU]	$w_{1/2}$ [s]
- 5,1	15,44	1108	1,88
- 6	12,92	1096	1,52
-7	11,88	1123	1,44
- 8,3	9,12	1096	1,32

Tab. 24: Einfluß der Separationsspannung auf die Xanthinpeak-Daten

Trotz der mit einer Spannung von 8,3 kV erzielten geringsten Migrationsdauer und Peakbreite wurden anschließende Trennungen mit nur 7 kV durchgeführt. Ausschlaggebend für diese Entscheidung war ein instrumentelles Problem, da die Hochspannungsquellen aufgrund von technischen Randbedingungen nicht dauerhaft eine Potentialdifferenz von 8,3 kV liefern konnten.

Unabhängig von der zwischen Reservoir 2 und 5 herrschenden Potentialdifferenz, wurde während der Trennvorgänge eine *push-back*-Spannung von -0,2 kV (Reser-

voir 1) und -0,5 kV (Reservoir 3) an die beiden Seitenkanäle angelegt. Hierdurch wurde verhindert, daß die Probe auch nach der Injektion noch in den Hauptkanal gelangen und eine Bandenverbreiterung hervorrufen konnte. Eine weitere Erhöhung der *push-back*-Spannung an Reservoir 2 führte zu einem verstärkten Eindringen des CE-Puffers aus dem Haupt- in den Seitenkanal, so daß bei den darauffolgenden Analysen die Injektionszeit verlängert werden mußte, um den *doppel-T*-Bereich wieder mit einer repräsentativen Probenzusammensetzung zu füllen. Die Spannung an Kanal 3 wurde bei -0,5 kV belassen, da ein stärkeres Zurückdrücken der Probe in die zum Abfall-Reservoir führende Kapillare keine negativen Auswirkungen auf die Gesamtanalysendauer hatte.

3.4.1.3 Injektionsdauer

Der elektrokinetische Modus erforderte eine Mindestinjektionszeit, in der gewährleistet sein mußte, daß auch die Probenkomponente mit der langsamsten Wanderungsgeschwindigkeit den *doppel-T*-Bereich erreicht hatte, wobei jedoch eine Überladung vermieden werden sollte, da diese zu einer Verbreiterung der Analyt-Bande führen kann.

In Abbildung 60 sind die Elektropherogramme dargestellt, die mit einer Injektions- bzw. Separations-Spannung von 0,5 kV und 7 kV und vier verschiedenen Injektionszeiten aufgenommen wurden. Die Migrationszeiten, Xanthin-Peakhöhen sowie die Peakbreiten in halber Höhe sind in Tabelle 25 zusammengefaßt:

Injektionszeit [s]	Migrationszeit [s]	Peakhöhe [mAU]	$w_{1/2}$ [s]
5	9,14	753	1,26
15	10,06	1385	1,5
30	10,08	1124	1,6

Tab. 25: Einfluß der Injektionszeit auf die Peakdaten

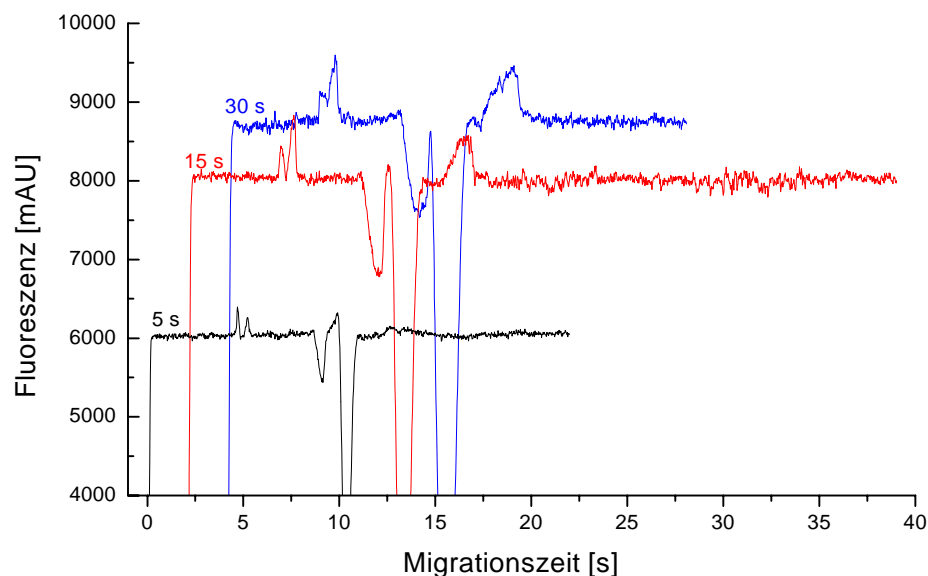


Abb. 60: Einfluß der Injektionsdauer auf die Xanthin-Trennung; 2 mM Xanthin; 1 μ M Fluorescein; 0,5 kV Injektionsspannung, 7 kV Separationsspannung

Da Xanthin als Anion eine elektrophoretische Mobilität aufwies, die dem elektroosmotischen Fluß entgegengesetzt war, konnten über eine Erweiterung der Injektionsdauer von 5 auf 15 s mehr Analytmoleküle über Elektroosmose in den *doppel-T*-Bereich transportiert werden, was sich in einer Erhöhung des Peaks um 84% bemerkbar machte. Sowohl der Xanthin- als auch der benachbarte Systempeak verbreiterten sich aufgrund der verlängerten Injektionsdauer, jedoch stellte sich weiterhin noch eine Grundlinienauflösung beider Signale ein. Wurde die Injektion nochmals um 15 s auf 30 s erweitert, kam es zu einer deutlichen Überladung des Schnittpunktes, was sich darin äußerte, daß beide Peaks so stark verbreitert wurden und teilweise überlappten, so daß keine Grundlinienauflösung mehr stattfinden konnte. Auch stieg die Peakhöhe nicht weiter an, sondern nahm aufgrund der Verbreiterung um 18,8% ab. Diese Verbreiterung hatte letztendlich auch Auswirkungen auf die Migrationszeit. Über die zur Auswertung der Elektropherogramme verwendete Software (Microcal™Origin™ Version 5.0, Microcal Software Inc., Northampton, USA) wurden die Migrationszeiten unter Annahme einer Gauß'schen Peakform aus dem Zentrum des Signals ermittelt. Aufgrund der zunehmenden Ausdehnung der Signale mit ansteigender Injektionsdauer verschob sich dieses Zentrum immer weiter, woraus längere Migrationszeiten resultierten.

Aus dieser Untersuchungsreihe ergab sich eine optimale Injektionsdauer von 15 s bei einer angelegten Potentialdifferenz von 0,5 kV, die für alle folgenden Trennungen eingehalten wurde.

3.4.1.4 Kalibration

Nach der Optimierung der Fluorescein-Konzentration (1 μM), der Separations-Spannung (- 7 kV) und der Injektionsdauer (15 s) wurde das System mittels Analyse von drei verschiedenen Xanthin-Standards kalibriert. In Abbildung 61 wurden die resultierenden Peakhöhen gegen die Xanthin-Konzentration aufgetragen:

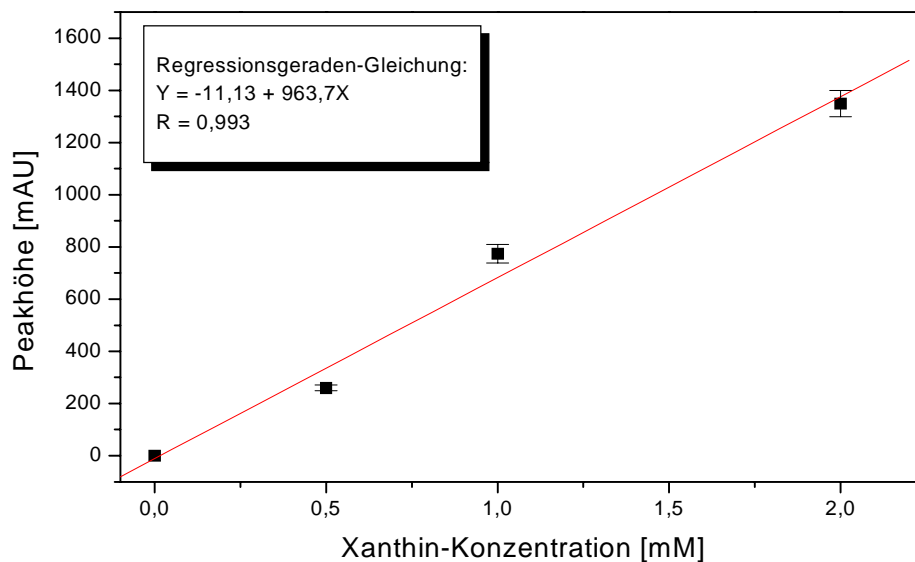


Abb. 61: Xanthin-Kalibrierkurve, 10 mM CE-Puffer, 1 μM Fluorescein, 15 s Injektion bei - 0,5 kV, Separationsspannung: - 7 kV

Über den gesamten untersuchten Bereich wurde ein linearer Zusammenhang zwischen der Xanthin-Konzentration und der Signalhöhe beobachtet. Die Empfindlichkeit des Nachweisverfahrens lag bei 694 mAU/mM Xanthin. Mit Hilfe der Geradengleichung wurde unter den gegebenen Bedingungen ein Detektionslimit von 200 μM (34,8 mg/l) Xanthin berechnet ($S/N = 3$).

3.4.1.5 Einfluß von Glucose

Alle bisherigen μCE -Analysen wurden ausschließlich mit Xanthin-Standards durchgeführt. Im allgemeinen liegen in Realproben natürlich noch andere Kom-

ponenten in unterschiedlichen Konzentrationen vor. Bei Fermentationsproben handelt es sich hierbei um die Medienbestandteile oder von Zellen sekretierte Substanzen. Da das zur Kultivierung von *E.coli* verwendete HDF-Medium Glucose in großem Überschuß enthielt (siehe Tab. 19), wurde das Kohlenhydrat gewählt, um den Einfluß einer zweiten Probenkomponente auf die Xanthin-Trennung zu untersuchen. Die aufgenommenen Elektropherogramme für eine reine Glucose-Lösung (10 mM) und eine Glucose/Xanthin-Mischung (10 mM/1 mM) sind in der folgenden Abbildung 62 dargestellt.

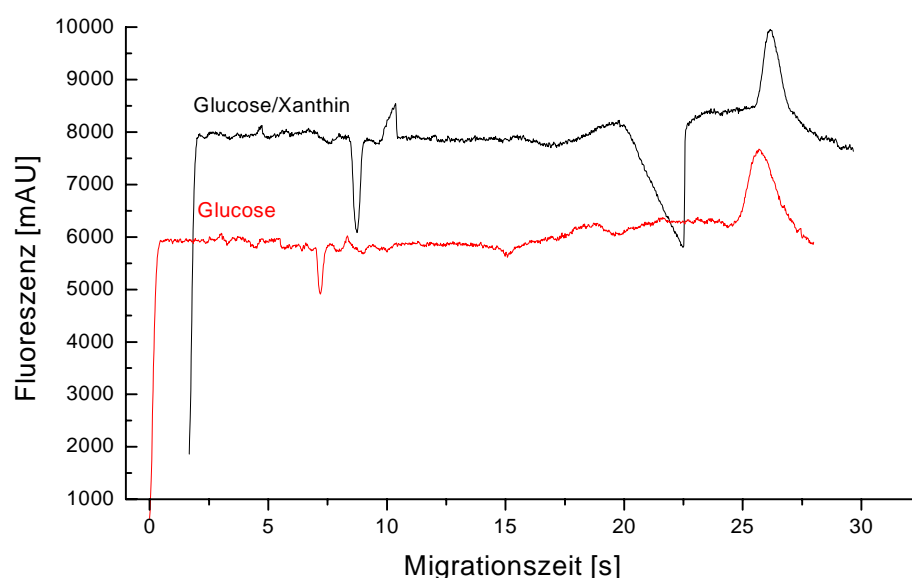


Abb. 62: Einfluß von Glucose auf die Xanthin-Trennung mit indirekter LIF-Detektion

Diese Trennung wurde ausnahmsweise mit einer CE-Pufferkonzentration von 20 mM durchgeführt, während die Probe weiterhin in 10 mM Puffer gelöst wurde. Aus der veränderten Elektrolyt-Ionenstärke und Probenzusammensetzung erklärten sich die Abweichungen zu den in den vorherigen Abschnitten gezeigten Elektropherogrammen. Die Injektion der Probe mit einer geringeren Leitfähigkeit führte zur Ausbildung eines negativen *Kohlrausch-EOF-Peaks* (7,2 s), dem beim Eintrag einer reinen Glucose-Lösung ein stark verbreiteter positiver Systempeak folgte (25,98 s). Aufgrund der Ausbildung eines Glucose-Borat-Komplexes, wies das Kohlenhydrat eine geringere effektive Mobilität als das Fluorophor auf. Polyole wie Glucose werden vorzugsweise im alkalischen pH-Bereich (pH 8 – 10), in dem durch die erhöhte OH⁻-Konzentration Tetraborat B(OH)₄⁻ gebildet wird, komplexiert (Wei *et al.*, 1997). Durch die Komplexbildung veränderte sich somit sowohl der Molekülradius als auch die

Netzladung der Glucose, so daß sie langsamer migrierte als das ebenfalls negativ geladene Fluorescein. Aufgrund dieses Beweglichkeitsunterschiedes bildete sich wie unter 3.3.2.2 erläutert eine Zone aus, in der die Probe abwesend und mit Ausnahme des Fluoresceins die weiteren Elektrolytbestandteile in reduzierter Konzentration vorlagen, so daß ein positiver Systempeak resultierte. Da die Analyse nach 30 s abgebrochen wurde, konnte das indirekte Signal der langsam migrierenden Glucose nicht mehr detektiert werden. Die Injektion einer Glucose/ Xanthin-Lösung führte zu einer Verdrängung des Fluoresceins durch die Nukleobase und damit zur Ausbildung eines indirekten negativen Peaks (20,82 s). Über das stark *frontende* Signal drückte sich wiederum die geringere Leitfähigkeit der Probe gegenüber dem Puffer aus. Obwohl die Trennung dieser Probe nicht weiter optimiert wurde, zeigte das Ergebnis deutlich, daß Xanthin auch neben anderen Komponenten mittels indirekter Fluoreszenz in mikrofluiden Systemen nachgewiesen werden konnte.

3.4.2 Enzymassay im kontinuierlichem μ -Fließsystem

3.4.2.1. Optimierung der CL-Detektion

Nach der Übertragung des rein elektrophoretischen Xanthin-Nachweises von einem Makro- auf ein Mikrosystem, wurde für einen enzymatischen Nachweis mit Xanthin-Oxidase und Chemilumineszenz-Detektion ein Assay in einem miniaturisierten kontinuierlichen Fließsystem entwickelt.

Alle Untersuchungen zur enzymatischen Xanthin-Bestimmung im kontinuierlichen Fließsystem wurden mit dem POCRE-1-Chip und der in Tab. 7 beschriebenen Konfiguration durchgeführt. Die ersten Experimente dienten zur Optimierung der CL-Reaktion und beruhten daher auf dem Einsatz von POD (2mg/ml), Luminol und H_2O_2 , jeweils gelöst in 50 mM Borat-Puffer pH 9. In Tab. 26 sind die mit verschiedenen Luminol-/ H_2O_2 -Konzentrationen nach Subtraktion des Grundsignals erhaltenen CL-Emissionen zusammengefaßt. Trotz der täglichen Konditionierung des Chips zu Beginn des Meßtages durch Spülen für jeweils 10 min mit 1 M NaOH, H_2O dest. und Puffer vergingen bei der ersten Messung etwa 3 min, bevor ein Signal detektiert werden konnte. Im weiteren Verlauf eines Meßtages verkürzte sich diese Zeit bis zur Signalentstehung beispielsweise nach einem vorhergehenden Puffer-Spülschritt auf 15 s. Möglicherweise war eine NaOH-Konditionierung von 10 min nicht ausreichend lang genug, um sofort einen stabilen EOF zu erzeugen, so daß dieser sich erst mit

Durchführung der ersten Experimente etablierte und zu der verkürzten Analysendauer führte.

Messung	Luminol-Konz.	H ₂ O ₂ -Konz.	CL-Signal [mAU]
A	0,5 mM	50 µM	33
B	1 mM	50 µM	88
C	5 mM	50 µM	100
D	10 mM	50 µM	78
E	10 mM	1 mM	1433

Tab. 26: Effekt der Luminol- und H₂O₂-Konzentration auf das CL-Signal im kontinuierlichen Fließsystem; 2 mg/ml POD-Lösung

Das CL-Signal wurde durch die ansteigenden Luminol-Konzentrationen bei konstanter H₂O₂-Konzentration kaum beeinflusst. Im Vergleich zu der CL-Emission, die mit 10 mM Luminol und 1 mM H₂O₂ erhalten wurde (Tab. 26/Messung E), waren diese Signale sehr gering und ihr Höhenunterschied zu klein, um klare Aussagen über den Einfluß der ansteigenden Luminol-Konzentration treffen zu können. Da lediglich die Kombination 10 mM Luminol/1 mM H₂O₂ zu einem ausreichend hohen Signal führte, wurden die nachfolgenden Untersuchungen mit diesen Reagenzienkonzentrationen durchgeführt.

3.4.2.2 Optimierung der Detektorposition

Für die im vorangegangenen Abschnitt beschriebene Studie wurde der Detektor willkürlich über der in Fließrichtung hinter dem Y-Schnittpunkt liegenden Kapillare positioniert, so daß dieser gerade noch im Sichtfeld des Mikroskop-Objektives lag. Zur Überprüfung in welcher Entfernung vom Schnittpunkt die CL-Emission ihren Maximalwert annahm, wurde der Chip während einer Messung in 30 s-Abständen etwa 54 µm (Vierteldrehung der Justierschraube am Translationstisch) vom Y-Stück aus in Fließrichtung unter dem Objektiv bewegt. Das über einen Zeitraum von 21,5 min aufgezeichnete Signal ist in Abbildung 63 wiedergegeben.

Aufgrund des laminaren Fließverhaltens, das in den rechteckigen Mikrokanälen vorherrschte, konnte eine CL-Emission erst in einem Abstand von etwa 490 µm vom

Y-Schnittpunkt entfernt detektiert werden. Bis zu dieser Position fand keine ausreichende Diffusion der Reaktionspartner statt, so daß es lediglich zur Aufzeichnung des Grundsignales kam. Ab einer Distanz von 490 µm stieg das CL-Signal sehr schnell an und erreichte bei etwa 550 µm seinen Maximalwert. Die im Anschluß auftretende kurzzeitige sprunghafte Signalabnahme war auf eine lokale Verunreinigung im Chip zurückzuführen, da die CL bei einer weiteren Verschiebung des Chips unter dem Objektiv wieder anstieg. Mit zunehmender Entfernung vom Mischpunkt verringerte sich die detektierte Emission schließlich kontinuierlich.

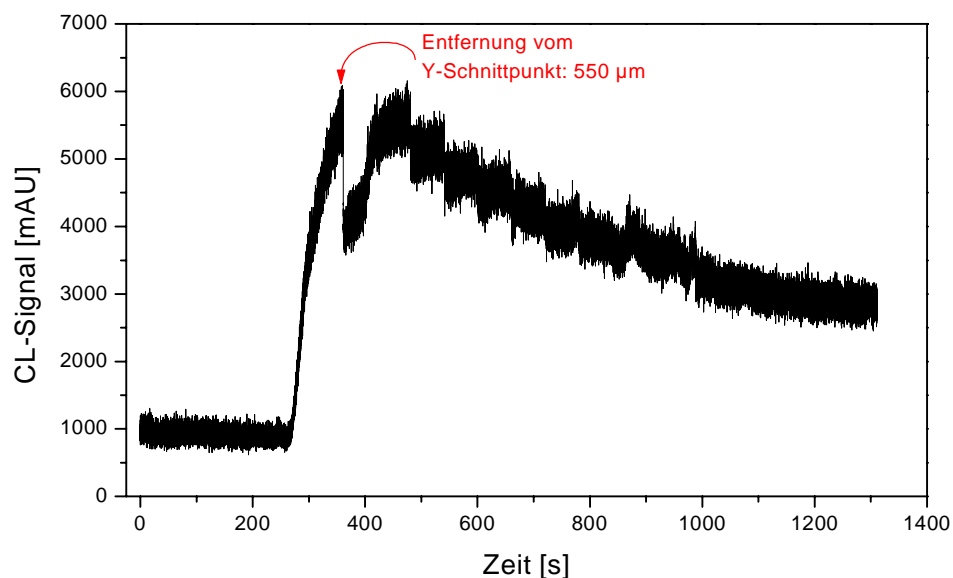


Abb. 63: Optimierung der Detektorposition durch Verschiebung des Chips um 54 µm/30 s; 10 mM Luminol, 1mM H₂O₂, 2 mg/ml POD

Alle weiteren Untersuchungen im POCRE-1-Chip zur enzymatischen Xanthin-Bestimmung über Chemilumineszenz wurden durchgeführt, indem der Detektor ausgehend vom Y-Schnittpunkt in einem Abstand von 550 µm positioniert wurde.

3.4.2.3 Homogener Enzymassay

Nach der Optimierung der Detektionsreaktion und der Position des Mikroskop-Objektives wurde die H₂O₂-Lösung in Reservoir 4 gegen eine XOD/Xanthin-Mischung ausgetauscht. Diese ungünstige durch das gemeinsame Vorliegen von Enzym und Substrat in einem Reservoir hervorgerufene Konfiguration konnte nicht vermieden werden, da mit geänderten Chip-Belegungen kein CL-Signal beobachtet wurde. Auch bei Verwendung der reinen H₂O₂-Lösung erwies sich lediglich die in

Tabelle 7 angegebene Konfiguration als erfolgreich bei der Erzeugung von Chemilumineszenz. Aus diesem Grund wurde der vergleichsweise hohe Verbrauch an XOD durch Mischen mit Xanthin akzeptiert.

Unter Berücksichtigung des Ergebnisses zur Optimierung der CL-Reaktion, das zum Erreichen eines deutlichen Signals eine Mindestmenge von 1 mM H_2O_2 erforderte und unter Annahme eines vollständigen enzymatischen Substratumsatzes, wurde zunächst 1 mM Xanthin mit einer XOD-Lösung (2mg/ml) in einem Reaktionsgefäß vermischt und anschließend in Reservoir 4 pipettiert. Die CL-Emission, die mit diesem Ansatz erhalten wurde, betrug nur 18,2% im Vergleich des unter identischen Bedingungen (10 mM Luminol, 2 mg/ml POD) mit einer reinen 1 mM H_2O_2 -Lösung detektierten Signals (Abb. 64). Da es sich bei der XOD um ein Enzym mit geringer Aktivität (0,1 U/mg) handelte, wurde diese Signalverringerung auf einen Mangel an zur Verfügung stehenden aktiven Zentren des Enzyms zurückgeführt, um 1 mM Xanthin in etwa 30 s vollständig zu H_2O_2 konvertieren zu können. Durch eine Erhöhung der eingesetzten XOD-Menge auf 10 mg/ml konnte ein Anstieg des Signals beobachtet werden, jedoch lag dieses mit 42% weiterhin deutlich unter dem Peroxid-Signal zurück (Abb. 64/2. Säule). Die begrenzte Menge der für diese Versuchsreihe zur Verfügung stehenden Xanthin-Oxidase führte zu einem Verzicht, durch noch größere Enzymkonzentrationen einen höheren Substratumsatz und damit eine weitere Erhöhung des CL-Signals zu erreichen. Um den Xanthin-Umsatz dennoch zu steigern, wurde die Inkubationszeit der XOD/Xanthin-Mischung außerhalb des Chips von etwa 30 s auf 10 min erweitert. Jedoch zeigte die verlängerte Reaktionsdauer einen negativen Einfluß auf das CL-Signal, das mit 16,2% ein Niveau erreichte, das im gleichen Größenordnungsbereich wie die mit 2mg/ml XOD erzielte CL-Emission lag. Ursache für diese Signalverringerung war eine Inhibierung der XOD durch das gebildete H_2O_2 , wodurch die Xanthin-Konvertierung und damit die weitere H_2O_2 -Produktion herabgesetzt wurde. Wurde das Enzym/Substrat-Gemisch direkt in das Chip-Reservoir pipettiert, wurde dieses Phänomen nicht beobachtet, da aufgrund der unterschiedlichen elektrophoretischen Mobilitäten das Reaktionsprodukt vom Enzym abgetrennt wurde. Daher wurde im folgenden auf eine ausgedehnte Präinkubationszeit verzichtet. Mit einer XOD-Menge von 10 mg/ml (1 Unit), war es unter den gewählten Bedingungen möglich, auch eine auf 0,5 mM herabgesetzte Substratkonzentration zu detektieren (Signalhöhe 31,2%). Der Zusatz von EDTA, der bei der amperometrischen Xanthin-Bestimmung im konventionellen FIA-System einen

positiven Effekt sowohl auf die Signalhöhe als auch auf die -stabilität zeigte, blieb bei dieser Applikation ohne Einfluß. Wie in Abbildung 64 dargestellt, verringerte sich das CL-Signal bei der Zugabe von 0,25 mM EDTA sogar leicht um 2%, was im Rahmen der Meßungenauigkeit jedoch nicht als signifikant zu betrachten war, so daß nicht auf eine inhibierende Wirkung des Komplexbildners geschlossen werden konnte.

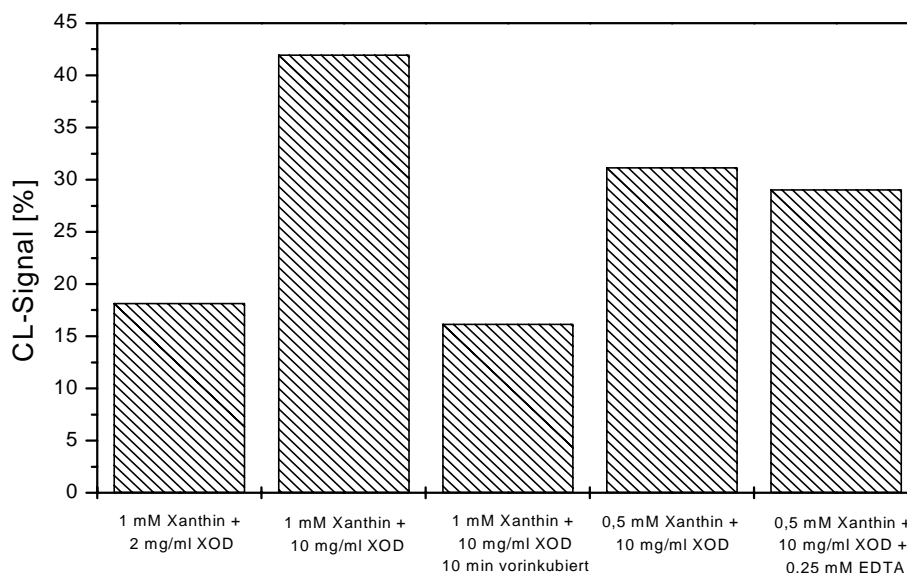


Abb. 64: CL-Signal von XOD/Xanthin-Mischungen; 2 mg/ml POD-Lösung, 10 mM Luminol (die prozentualen Angaben beziehen sich auf das Signal, das mit 1 mM H_2O_2 anstelle von XOD/Xanthin erhalten wurde)

Neben den eingesetzten Reagenzien-Konzentrationen wurde auch die Fließgeschwindigkeit im Chip über die Änderung der angelegten Spannung variiert. Mit Potentialen von 1 und 2,5 kV konnte jedoch keine CL-Emission beobachtet werden, da der EOF möglicherweise zu stark herabgesetzt wurde und der H_2O_2 -Transport nicht mehr ausreichend gewährleistet war. Aufgrund der bekannten Zersetzung von Luminol bei hohen Feldstärken (Mangru, 1997) wurden Potentiale oberhalb von 5 kV nicht weiter untersucht.

3.4.2.4 Heterogener Enzymassay

Das Ziel der enzymatischen Xanthin-Bestimmung in einem Mikrochip war die Entwicklung eines Systems, das die in der konventionellen FIA bereits ausgenutzte Wiederverwertbarkeit der Enzyme gewährleistete. Hierzu mußte zunächst überprüft werden, ob der in homogener Form erfolgreiche Assay auch in einem heterogenen

Format mit immobilisierten Enzymen - einer wesentlichen Voraussetzung zur Entwicklung eines wiederverwertbaren Systems - durchgeführt werden konnte. Ein zweiter essentieller Punkt, die lokale Fixierung des Immobilisats innerhalb des Kapillarnetzwerkes, ließ sich mit dem POCRE-1-Layout nicht realisieren, daher wurde in diesem Chip zunächst allgemein der Einfluß der POD- und XOD-Immobilisierung auf das CL-Signal untersucht.

Beide Enzyme wurden, wie unter 2.2.3.1 beschrieben, über Glutardialdehyd auf Nucleosil-Beads mit einem Durchmesser von 5 μm gekoppelt. Zur erneuten Überprüfung der CL-Detektionsreaktion wurde zu Beginn der Untersuchungsreihe wiederum das POD/Luminol/ H_2O_2 -System eingesetzt. Die in Reservoir 1 enthaltene POD-Lösung wurde dabei gegen eine gepufferte POD-Bead-Suspension ausgetauscht, wobei darauf geachtet wurde, daß der Bead-Anteil nicht zu hoch war, um so einer Verschließung der Kanalöffnung durch eine zu große Anzahl sedimentierter Teilchen entgegenzuwirken. Daher wurden 50 μl der Suspension in einem Bead/Puffer-Verhältnis (v/v) von etwa 1:10 in Reservoir 1 plaziert, so daß auch bei einer kontinuierlichen Messung ausreichend POD-Beads zur Verfügung standen, gleichzeitig das Trägermaterial aber stark genug verdünnt wurde, um einen Verschuß der Kapillaröffnung zu verhindern. Mittels des in Tabelle 8 angegebenen Spannungsprogramms wurden die Beads, wie zuvor die Enzymlösung, kontinuierlich durch das Fließsystem transportiert und die emittierte CL an der optimierten Detektorposition (550 μm hinter dem Y-Schnittpunkt) bestimmt. Unter Verwendung der immobilisierten POD, 10 mM Luminol und 1 mM H_2O_2 wurde mit 6050 mAU ein im Vergleich zum gelösten Enzym um 10% erhöhtes CL-Signal erhalten. Durch den Austausch des Wasserstoffperoxids gegen 10 mg/ml XOD und 1 mM Xanthin verringerte sich dieses Signal jedoch auf 559 mAU (Abb. 65). Die Messung mit gelöster POD hatte zu einer CL-Emission von 1322 mAU geführt, so daß die Immobilisierung sich negativ auf die Xanthin-Bestimmung auswirkte und eine Signalabnahme von 57,7% herbeiführte. Da für den homogenen und heterogenen Assay identische absolute Enzymmengen eingesetzt wurden, resultierte die Signalverringering möglicherweise aus einer Adsorption von nicht umgesetztem Xanthin an die POD-Beads, wodurch der Zugang von H_2O_2 zum Enzym erschwert wurde. Im umgekehrten Fall, bei einer Immobilisierung der XOD und Verwendung gelöster POD nahm die CL noch weiter ab (Abb. 65/mittlere Säule). Bei Vorlage von XOD-Beads, die mit einer Enzymkonzentration von 10 mg/ml immobilisiert wurden, und 1 mM

Xanthin in Reservoir 4, betrug die emittierte CL lediglich 60 mAU. Verglichen mit dem Signal, das aus dem entsprechenden Experiment mit gelöster XOD resultierte, wurde eine Abnahme der CL-Emission um 95,5% beobachtet. Eine Erhöhung der Substratkonzentration auf 5 mM hatte keinen nennenswerten Einfluß und verstärkte das Signal lediglich auf 70 mAU.

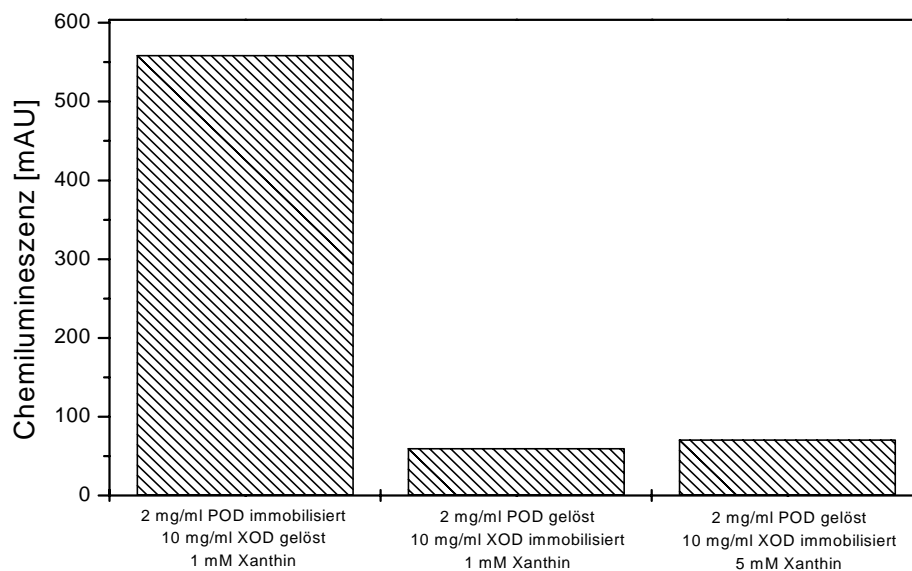


Abb. 65: Einfluß der Enzymimmobilisierung auf das CL-Signal im kontinuierlichen Fließmodus

Dieser große Verlust war durch die Immobilisierung der XOD auf die im Vergleich zum unter 3.2.3. verwendeten CPG (120 – 200 μm) kleineren Nucleosil-Beads (5 μm) zu erklären. Aufgrund der kleineren Oberfläche wurde möglicherweise eine geringere Menge XOD immobilisiert, woraus die deutliche Signalabnahme resultierte. Darüber hinaus wiesen die Poren dieser Beads (1000 Å) nicht die vom Hersteller zur Immobilisierung von Enzymen wie der Xanthin-Oxidase mit einem Molekulargewicht von 300 kDa empfohlene Mindestgröße von 1400 Å auf, wodurch die Effektivität der kovalenten Kopplung möglicherweise nochmals eingeschränkt wurde. Aufgrund der geringen Kapillardimensionen war es jedoch nicht möglich, ein Trägermaterial mit größerem Durchmesser für die Untersuchungen in einem Mikrochip einzusetzen. Wurden beide Enzyme in immobilisierter Form eingesetzt, konnte keine CL-Emission mehr beobachtet werden. Die Ergebnisse zeigten aber dennoch, daß die Durchführung von enzymatischen Assays in einem mikrofluiden System möglich waren und daß die Chemilumineszenz-Detektion eine geeignete Alternative zur sonst üblichen LIF-Detektion darstellte.

3.4.3. Mikro-Fließsystem mit integriertem Reaktor

Um ein mehrfach zu verwendendes enzymatisches Analysesystem zu erhalten, in dem das Immobilisat örtlich fixiert werden konnte, wurde ein verändertes Chip-Layout eingesetzt. Der in Abbildung 17A gezeigte RCC-Chip enthielt eine in das Kapillarnetzwerk integrierte Kavität, in die über einen schmalen Zugangskanal Enzymbeads elektroosmotisch gepackt werden konnten. In Abb. 66 ist ein schematischer Querschnitt der Kammer und der angrenzenden Kanäle 1 und 2 gezeigt.

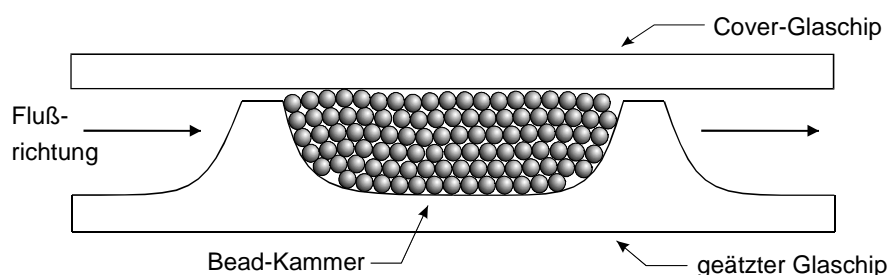


Abb. 66: Schematische Querschnittsdarstellung der Bead-Kammer des RCC-Chips (Oleschuk et al., 2000)

3.4.3.1 Beladung des Reaktors

Wie bereits die Experimente im POCRE-1-Chip ergeben hatten, bewegten sich die Nucleosil-Beads im elektrischen Feld in Richtung der Kathode. Mit dem in Tabelle 8 angegebenen Spannungsprogramm, bei dem die Kanäle 1 und 2 geerdet und an den schmalen Kanal 3 ein positives Potential von +800 V angelegt wurde, ließen sich die Beads in die Kavität packen. Die Abbildungen 67A und 67B zeigen Photos, die mit Hilfe einer CCD-Kamera während eines solchen Packvorganges aufgenommen wurden.

Aufgrund der Krümmung des Kammereinganges führten die elektrischen Feldlinien in einer gebogenen Form in die Kavität hinein. Da der elektrokinetische Transport der Beads wiederum entlang dieser Feldlinien erfolgte, wurden sie praktisch in die Kammer gesprüht (Abb. 67A) und anschließend regelmäßig gepackt (Abb. 67B).

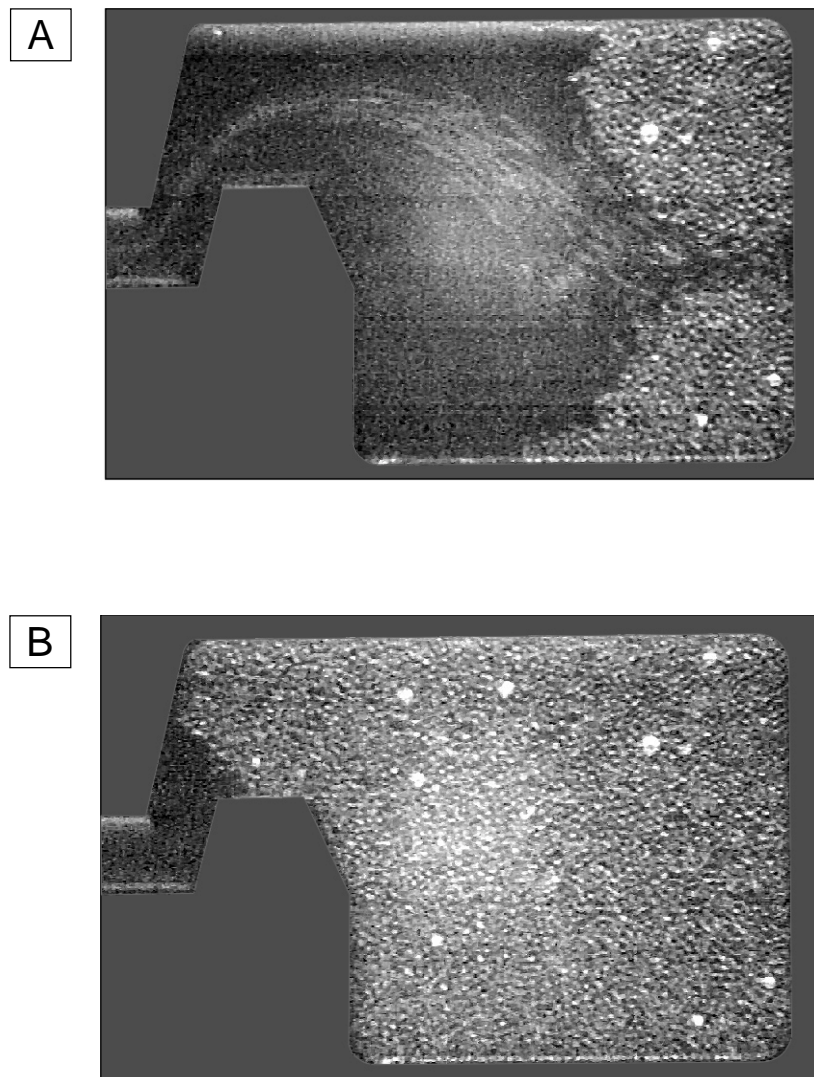


Abb. 67: Elektrokinetische Reaktorbeladung (Oleschuk et al., 2000)

Zur vollständigen luftblasenfreien Beladung der Kammer wurden durchschnittlich etwa 10 min benötigt. Eine Erhöhung des Potentials über die angelegten +800 V hinaus führte zu einer Aggregation des Trägermaterials und damit zu einem Abbruch des Transportprozesses.

3.4.3.2. Optimierung der Chemilumineszenz-Reaktion

Zunächst wurde auch mit diesem Layout die Chemilumineszenz-Reaktion optimiert, indem ausschließlich POD-Beads (2 mg/ml) in die Kavität gepackt und Luminol, H_2O_2 und Borat-Puffer entsprechend den Angaben aus Tabelle 8 in die drei Reservoirs pipettiert wurden. Das gewählte und ebenfalls in dieser Tabelle

angebende Spannungsprogramm führte zu einer Vermischung von Luminol und Wasserstoffperoxid über dem POD-Bead-Bett. Aufgrund der aus den Chemilumineszenz-Messungen im POCRE-Chip resultierenden Ergebnisse wurde der Detektor jedoch nicht direkt über der Kavität positioniert, sondern etwas weiter flußabwärts, um so eine vollständigere Diffusion zu erreichen. Das Mikroskop-Objektiv wurde daher so über Kanal 1 justiert, daß der den Reaktor begrenzende Steg gerade noch im Sichtfeld lag.

Die ersten Untersuchungen wurden zunächst mit den in Tabelle 27 angegebenen Luminol- und H_2O_2 -Konzentrationen durchgeführt. Auch bei diesem Chip-Design dauerte es zu Beginn eines Meßtages etwa 3 min bis sich ein stabiler elektro-osmotischer Fluß ausgebildet hatte und das erste CL-Signal detektiert werden konnte. Zwischen den einzelnen Läufen reduzierte sich diese Wartezeit auf 10 s.

Messung	Luminol-Konz.	H_2O_2 -Konz.	CL-Signal [mAU]
A	0,5 mM	50 μM	445
B	0,5 mM	100 μM	1372
C	1 mM	100 μM	2522
D	10 mM	1 mM	4045

Tab. 27: Einfluß der Luminol- und H_2O_2 -Konzentration auf das CL-Signal bei Einsatz eines POD-mikro-Reaktors

Die ebenfalls in Tabelle 27 angegebenen CL-Emissionen machten deutlich, daß auch hier mit einer Kombination von 10 mM Luminol/1 mM H_2O_2 die höchsten Intensitäten erzielt wurden. Im Gegensatz zu den POCRE-Chip-Untersuchungen führten aufgrund der größeren zur Verfügung stehenden Katalysatormenge auch geringere Konzentrationen bereits zu deutlichen CL-Signalen. Die in Tabelle 27 zusammengefaßten Emissionen entsprachen den Ausgangssignalen, die jeweils bei den ersten Messungen mit den entsprechenden Luminol/ H_2O_2 -Kombinationen detektiert wurden. Ein Vergleich von drei bzw. vier in Abbildung 68 dargestellten aufeinanderfolgenden Messungen zeigte jedoch, daß die Signalstabilität erheblich von den Reagenzien-Konzentrationen beeinflusst wurde. Mit einer 10 mM Luminol/1 mM H_2O_2 -Kombination wurde innerhalb von vier Messungen eine Signalabnahme auf 61% sowie eine Braunfärbung der gepackten POD-Beads beobachtet. Diese Ver-

färbung stand in direktem Zusammenhang mit der verminderten Emission, da es sich hierbei um ein bei hohen Luminolkonzentrationen gebildetes Produkt handelte, das die immobilisierte POD deaktiviert (Ikariyama *et al.*, 1980). Im POCRE-Chip wurde bei dieser Luminol-Konzentration keine CL-Abnahme ermittelt, da durch den kontinuierlichen Fließmodus stets frische POD-Beads als Katalysator zur Verfügung standen und eine durch Luminol hervorgerufene Deaktivierung bei dieser Betriebsweise vernachlässigbar klein blieb. Eine Verdünnung der Luminol- und H_2O_2 -Lösung um den Faktor 10 bedeutete eine Verbesserung der Signalstabilität, indem nach vier Messungen noch 71,3% der Ausgangsintensität nachgewiesen werden konnten. Sehr positiv auf das Signalverhalten zwischen einzelnen Messungen wirkte sich ein zusätzlicher Pufferspülschritt aus, der das Enzymbett praktisch vollständig regenerierte und der Luminol-Deaktivierung effektiv entgegenwirkte. Der Signalthöhenunterschied zwischen der ersten und dritten Messung blieb dann im Bereich der Meßgenauigkeit des Photomultipliers, so daß kein Sensitivitätsverlust auftrat.

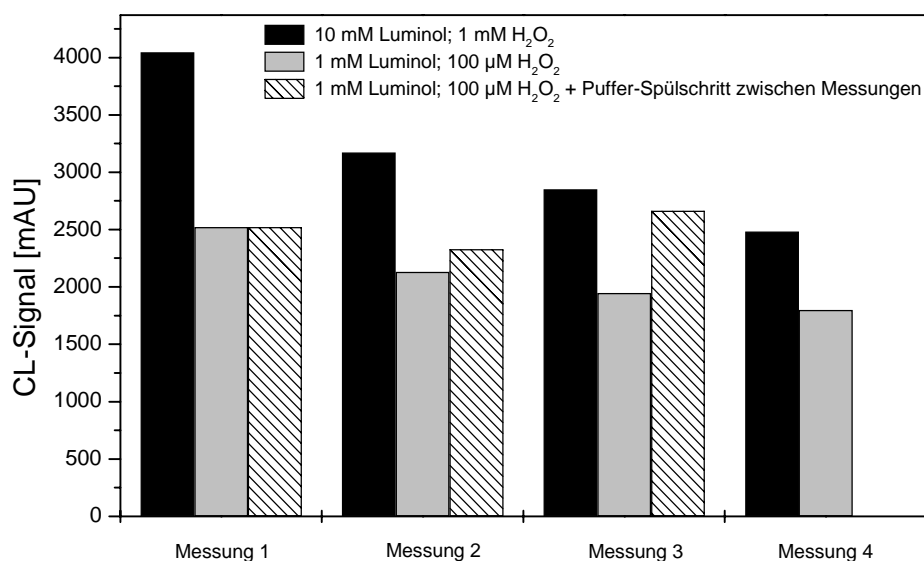


Abb. 68: Einfluß der Luminol- und H_2O_2 -Konzentration auf das CL-Signal bei Einsatz eines POD-mikro-Reaktors

Unter Berücksichtigung dieser Ergebnisse wurden nachfolgende Experimente mit einer Kombination von 1 mM Luminol/100 μM H_2O_2 sowie Pufferspülschritten zwischen den einzelnen Messungen durchgeführt.

3.4.3.3 Optimierung der Fließgeschwindigkeit

Die bisher beschriebenen Untersuchungen im RCC-Chip wurden mit einer an Kanal 1 angelegten Spannung von -400 V vorgenommen. Um den Einfluß der Fließgeschwindigkeit und damit verbunden der Diffusion auf das CL-Signal zu verifizieren, wurde das Potential an diesem Kanal variiert (Tab. 28).

Potential an Reservoir 1	CL-Signal [mV]
- 200 V	1544
- 400 V	1801
- 600 V	1568
- 1000 V	1527

Tab. 28: Einfluß der an Kanal 1 angelegten Spannung auf das CL-Signal; 1 mM Luminol, 100 μ M H_2O_2

Mit einer Spannung von 400 V wurde eine Fließgeschwindigkeit erzeugt, die sich als optimal für die Detektionsreaktion erwies. Durch die Erniedrigung bzw. Erhöhung des Potentials wurde der Fluß jeweils so beeinträchtigt, daß die CL nicht vollständig im Bereich des Detektorfensters emittierte und damit verringerte Signale beobachtet wurden. Auf eine weitere Optimierung der Detektorposition in Abhängigkeit von der jeweils angelegten Spannung wurde verzichtet und alle nachfolgenden Untersuchungen bei 400 V durchgeführt.

3.4.3.4 Xanthin-Detektion

Vor der Bestimmung von Xanthin über einen mit einer Mischung aus POD- und XOD-Beads gepackten μ -Reaktor wurden zunächst weitere Versuche durchgeführt.

Xanthin-Bestimmung über lösliche XOD

Für erste Untersuchungen zur Xanthin-Bestimmung im RCC-Chip wurde die Kavität ausschließlich mit POD-Beads gefüllt und die H_2O_2 -Lösung in Reservoir 2 gegen eine Mischung aus 10 mg/ml XOD und 1 mM Xanthin ausgetauscht. Der Assay wurde anschließend durch Anlegen der Spannung an Kanal 1 gestartet. Eine CL-Emission ließ sich jedoch bei diesem Ansatz auch bei einer Erhöhung der Substratkonzentration auf 5 mM Xanthin bzw. der eingesetzten Enzymaktivität nicht

beobachten. Ein daraufhin im Becherglas durchgeführter Assay zur Überprüfung der beteiligten Reagenzien (POD-Beads, 10 mg/ml XOD, 1 mM Xanthin, 1 mM Luminol) führte zu einer sofort einsetzenden CL-Emission, die zwar schwach, aber dennoch mit bloßem Auge zu erkennen war, so daß eine zwischenzeitlich aufgetretene Enzym- oder Chemikaliendeaktivierung ausgeschlossen werden konnte. Möglicherweise wurde die katalytische Aktivität der immobilisierten und örtlich fixierten POD durch die migrierende XOD und/oder Xanthin unterbunden, was im Fall von ebenfalls an eine feste Oberfläche gekoppelter, aber entlang des Kanalsystems transportierter Peroxidase nicht eintrat.

Xanthin-Bestimmung über immobilisierte und gepackte XOD

Da für den Assay zur Xanthin-Bestimmung im POCRE-Chip jeweils nur eines der beteiligten Enzyme in immobilisierter Form eingesetzt worden war, wurde vor der Beladung des RCC-Chips mit einer Mischung aus POD- und XOD-Beads die CL-Reaktion im Batch-Ansatz untersucht. Auch bei einer Kopplung beider Enzyme an die Nucleosil-Beads konnte ohne weitere Hilfsmittel eine schwache CL-Emission beobachtet werden. Nach der Feststellung, daß der Assay auch in dieser Form grundsätzlich ablief, wurde der μ -Reaktor elektrokinetisch mit XOD- und POD-Beads, die in einem Mischungsverhältnis von 2:1 (v/v) in Reservoir 3 vorlagen, beladen. Auch in diesen Fall wurde über 1 mM und 5 mM Xanthin keine Lichtentstehung beobachtet. Ein Austausch der Nukleobase gegen eine 100 μ M H_2O_2 -Lösung zeigte jedoch auch nur ein sehr geringes Signal für die eigentliche Luminol-Reaktion. Verglichen mit einem reinen POD-Reaktor wies das gemessene Signal nur noch 6,4% der ursprünglichen Höhe auf. Da das Packen dieses speziellen Kanalsystems aus nicht zu ermittelnden Gründen anstatt der sonst üblichen 10 min mehr als zwei Stunden andauerte, wurde zunächst vermutet, daß hierbei die Aktivität beider Enzyme durch Wärmeeinstrahlung herabgesetzt wurde. Zur optischen Kontrolle des Füllzustandes des Reaktors mußte der Chip mittels einer Tischlampe gut ausgeleuchtet werden. Aufgrund der großen Nähe der Lichtquelle zur Glasoberfläche kam es zu einer Übertragung der abgestrahlten Wärme auf den Chip und damit möglicherweise zu einer Denaturierung der immobilisierten Enzyme. Die Verwendung eines weiteren RCC-Chips, der die Beladung der Enzymbead-Mischung innerhalb der üblichen Zeitspanne zuließ, führte jedoch bei Einsatz einer Kombination von 1 mM Luminol und 100 μ M H_2O_2 zu vergleichbar geringen CL-

Emissionen. Eine Blockierung der Mikrokanäle durch mögliche eingedrungene Verschmutzungen konnte als Ursache für die Signalabnahme ausgeschlossen werden, da ein für diese Kanalgrößen (30 und 580 μM) und -geometrien charakteristischer Stromfluß von 1 μA bzw. 15 μA meßbar war. Die mit Hilfe eines homogenen POD-Reaktors optimierten Bedingungen erwiesen sich damit als nicht auf ein Bi-Enzymsystem übertragbar. Der gesamte Assay wurde durch das gemeinsame Vorliegen von POD- und XOD-Beads empfindlich gestört. Mit einer Kombination von 1 mM Luminol und 1 mM H_2O_2 wurde in diesem Fall ein Signal in der Höhe von 444 mV detektiert, das unter Verwendung einer reinen POD-Packung im allgemeinen mit einer 20-fach geringeren Substratkonzentration erzielt wurde. Durch die Zugabe von löslicher POD in Reservoir 3 konnte außerdem ausgeschlossen werden, daß dieses Phänomen aufgrund des XOD-Überschusses in der Enzymlösung auf eine zu geringe Menge gepackter POD-Beads zurückzuführen war, da das Signal unverändert blieb.

Der Einsatz von immobilisierter XOD zur Bestimmung von Xanthin erwies sich damit in diesem Fließsystem als nicht geeignet. Zurückzuführen war dies vermutlich zum einen auf ein ungünstiges Verhältnis zwischen der Größe der Nucleosil-Beads und der XOD, durch das eine effiziente Immobilisierung des Enzyms verhindert wurde. Zum anderen wurde durch die geringe Porengröße auch die Diffusion des Xanthins zum Enzym erschwert, so daß sich hieraus die H_2O_2 -Produktion so stark verringerte, daß sie nicht mehr zur Erzeugung eines CL-Signals führen konnte. Darüber hinaus wurde für den Assay ein pH-Wert von 9 gewählt, der sich als optimal für die Luminol-Reaktion erwies, aber deutlich vom pH-Aktivitätsmaximum der XOD von 7,5 (Barman, 1969) abwich. Aufgrund dieses pH-Unterschiedes wurde die Aktivität der löslichen XOD herabgesetzt, wodurch sich die deutlich verringerten Signale im Vergleich zu einer reinen H_2O_2 -Lösung erklären lassen. Da Luminol jedoch nur unter alkalischen Bedingungen in den benötigten Konzentrationen gelöst werden konnte, war eine Absenkung des pH-Wertes unter 9 nicht möglich.

Tabelle 29 gibt einen zusammenfassenden Überblick über die im POCRE- und RCC-Chip durchgeführten Untersuchungen zur Bestimmung von Xanthin über Chemilumineszenz-Detektion:

Chip/Betriebsweise	POD	XOD	CL (H ₂ O ₂)	CL (Xanthin)
POCRE/kontinuierliches Fließsystem	gelöst	-	✓	nb
POCRE/kontinuierliches Fließsystem	immobilisiert	-	✓	nb
POCRE/kontinuierliches Fließsystem	gelöst	gelöst	nb	✓
POCRE/kontinuierliches Fließsystem	gelöst	immobilisiert	nb	✓
RCC/Enzymreaktor	immobilisiert	-	✓	nb
RCC/Enzymreaktor	immobilisiert	gelöst	✓	✗
RCC/Enzymreaktor	immobilisiert	immobilisiert	✓	✗

Tab. 29: Zusammenfassung der CL-Messungen in mikrofluiden Systemen; -: nicht eingesetzt; nb: nicht bestimmt; ✓: CL-Signal detektiert; ✗: kein CL-Signal detektierbar

4. Zusammenfassung und Diskussion

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung alternativer Methoden zur Bestimmung von Purin-Nukleotiden in der Bioprozeßüberwachung, da bisher eingesetzte Verfahren für eine *on-line* Überwachung und damit mögliche Kontrolle ungeeignet sind. Da neben elektrophoretischen hierbei auch enzymatische Methoden im Mittelpunkt der Arbeit standen, wurde auf eine Erfassung aller Nukleotide verzichtet. Aufgrund der Tatsache, dass nur wenige enzymatische Detektionsprinzipien zur Nukleotid-Analytik zur Verfügung stehen, wurden Methoden zur Bestimmung von ATP bzw. Xanthin als repräsentative Vertreter dieser Substanzklasse evaluiert. Enzymatische und elektrophoretische Methoden wurden dabei gewählt, da erstere den Aufbau einfacher, automatisierbarer und damit *on-line* einsetzbarer Systeme gestatten, und letztere das Potential zur Etablierung integrierter miniaturisierter Analysesysteme, sogenannter μ TAS, besitzen, die ebenfalls prinzipiell an Prozesse koppelbar sein sollten. Zu prüfen war:

- ob sich enzymatische Systeme mit ausreichender Sensitivität und Stabilität zur Bestimmung von ATP und Xanthin in Fermentationsproben entwickeln lassen und ob mit diesen Systemen die Analysendauer im Vergleich zur bisher durchgeführten *off-line* HPLC-Bestimmung reduziert werden kann.
- in welcher Form die Kapillarelektrophorese als Instrument zur Bioprozeßüberwachung über die Bestimmung von Xanthin eingesetzt werden kann.
- ob eine Übertragung der elektrophoretischen Trennung bzw. des enzymatischen Xanthin-Assays auf ein mikrofluides System möglich ist und welche Modifikationen in Hinblick auf die Detektion und Konzentrationen der beteiligten Reagenzien eine Übertragung vom Makro- auf ein Mikrosystem erfordert.

4.1 ATP-Sensoren

4.1.1 Charakterisierung der GOD/HK-Elektroden

Die Charakterisierung der auf Basis von Platin-Dickschichtelektroden produzierten Bi-Enzymsensoren wurde im Durchfluß in einem Fließinjektions-Analysesystem vorgenommen. Die Co-Immobilisierung erfolgte über eine Quervernetzung mittels Glutardialdehyd auf der zuvor silanisierten Elektrodenoberfläche.

Da sich zur amperometrischen Detektion an Dickschichtelektroden nicht alle Puffersysteme als Medien eignen (Rohm, 1996), wurden für diese spezielle Applikation nur zwei - Kaliumphosphat- und Clark & Lubs-Puffer, beide pH 8 – verwendet. Der Zusatz von Magnesium, das als Cosubstrat für die Reaktion der Hexokinase notwendig war, führte zu einer Verringerung der elektrochemischen H_2O_2 -Oxidation, da sich die Ionen vermutlich auf der Elektrodenfläche ablagerten und somit eine Reduzierung der elektroaktiven Fläche bewirkten. Dieses auch als *Elektroden-Fouling* bezeichnete Phänomen wurde bei Verwendung von Clark & Lubs-Puffer stärker unterbunden, da die im Gegensatz zu Phosphat- zur Komplexbildung befähigten Borat-Ionen solchen Ablagerungen entgegenwirken konnten.

Die Sensitivität, das Detektionslimit sowie die Größe des linearen Meßbereiches der entwickelten Detektionssysteme zeigten Abhängigkeiten vom Verhältnis, in dem die Enzyme co-immobilisiert wurden und von der dem Trägerstrom zugesetzten Glucose-Konzentration. Als optimal erwies sich ein HK/GOD-Aktivitätsverhältnis von 1,5 – 2, mit dem eine Sensitivität von 51 pA/ μM sowie ein Detektionslimit von 8,1 μM ATP erzielt wurde. Eine Verschiebung des Verhältnisses weiter zu Gunsten der Hexokinase führte zu abnehmenden Empfindlichkeiten, einer Erhöhung des Detektionslimits und einer Verkürzung des linearen Meßbereiches. Im umgekehrten Fall, bei einer Immobilisierung eines Überschusses an GOD, nahm die Sensitivität auch ab, am deutlichsten machte sich das ungünstige Enzymverhältnis jedoch bei der Bestimmung der Nachweisgrenze bemerkbar, die mit 28,6 μM ATP berechnet wurde und sich somit um mehr als den Faktor 3,5 gegenüber dem optimierten Aktivitätsverhältnis erhöhte. Dies erklärte sich aus einem gesteigerten Glucose-Umsatz durch die GOD-Reaktion, so daß der konkurrierenden HK-Reaktion das Substrat nicht mehr in ausreichender Konzentration zur Verfügung stand, um eine größere ATP-Sensitivität zu erreichen. Der GOD-Überschuß führte auch zu einer Verschiebung des linearen Meßbereiches, dessen unteres Ende sich aufgrund der herabgesetzten Empfindlichkeit auf etwa 12 μM erhöhte, dafür jedoch mit einer oberen Grenze von 1 mM deutlich verlängert war. In Hinblick auf die Quantifizierung von ATP in Fermentationsproben war die Größe des linearen Bereiches im Vergleich zu den weiteren Sensoreigenschaften (Sensitivität, Detektionslimit) jedoch von untergeordneter Bedeutung.

Neben der Enzymkonzentration übte auch die dem Carrier zugesetzte Glucosemenge einen Einfluß auf die Qualität des Detektionssystems aus. Mit dem

festgelegten Enzymaktivitätsverhältnis erhöhte sich die Sensitivität des Detektors mit zunehmender Glucose-Konzentration in einem Bereich von 10 – 500 μM . Zurückzuführen war dies darauf, daß beiden Enzymen eine größere Substratmenge zur Verfügung stand, die zu einem vermehrten enzymatischen Umsatz und somit zu einer anwachsenden Differenz zwischen Grund- und ATP-Signal führte, was sich letztendlich auch in einer Verlängerung des linearen Meßbereiches ausdrückte. Wurde der Kohlenhydrat-Zusatz jedoch über eine kritische Grenze hinaus erhöht, hatten geringe ATP-Konzentrationen keinen Effekt mehr auf die Höhe des Grundsignals und die untere Grenze des Bereiches verschob sich auf 62,5 μM ATP (500 μM Glucose). Mit ansteigender Glucose-Konzentration erhöhte sich jeweils auch das ATP-Detektionslimit. Allgemein erwies sich unter Berücksichtigung aller Sensoreigenschaften ein Glucose-Zusatz in der Höhe von 50 μM zum Carrier als am besten geeignet (Sensitivität: 51 pA/ μM , Detektionslimit: 8,1 μM , linearer Bereich: 0 – 125 μM).

Als unzureichend erwies sich die Lagerstabilität der Bi-Enzymelektrode, die primär auf eine Deaktivierung der Hexokinase zurückzuführen war. Nach Lagerung des Sensors über Nacht bei 4°C nahm die Empfindlichkeit bereits um 39% ab und nach einer Lagerungsdauer von 48 Stunden erfuhr das Grundsignal bei Injektion einer ATP-Probe kaum noch eine Veränderung. Diese sehr schnell einsetzende Inaktivierung der Hexokinase könnte möglicherweise durch eine Immobilisierung des Enzyms in Gegenwart von Glucose verhindert werden. Bei einer Kopplung der HK über Glutardialdehyd wurde beobachtet, daß das von der Glucose besetzte aktive Zentrum des Enzyms während der Immobilisierung geschützt und so über eine Lagerungsdauer von zwei Monaten stabil blieb (Hansen *et al.*, 1993). Da in der vorliegenden Arbeit zwei Enzyme co-immobilisiert wurden, die um die Glucose konkurrierten, bleibt fraglich, ob die Stabilität des entwickelten Sensors auf diese Weise hätte verbessert werden können, da die GOD im Gegensatz zur HK, die Glucose in Abwesenheit von ATP nur bindet, das Substrat umsetzen würde und es somit möglicherweise nicht mehr zur HK-Stabilisierung zur Verfügung stehen würde.

4.1.2 Beurteilung gegenüber vergleichbaren ATP-Systemen

In der Literatur sind zwei vergleichbare, ebenfalls auf dem Enzympaar Glucose-Oxidase/Hexokinase beruhende ATP-Systeme beschrieben, wobei Scheller und Pfeiffer (1980) ATP über eine Bestimmung der Sauerstoffabnahme detektierten,

während Compagnone und Guilbault (1997) den aus der H_2O_2 -Oxidation resultierenden Stromfluß zur ATP-Quantifizierung heranzogen.

Mit einem vergleichbaren HK/GOD-Aktivitätsverhältnis von etwa 1,5 wurde bei einer Co-Immobilisierung zwischen zwei Polycarbonatmembranen, die anschließend vor eine auf +650 mV polarisierte Platinelektrode gespannt wurden, über die elektrochemische Umsetzung von H_2O_2 ein Detektionslimit von 10 μM und ein linearer Meßbereich von 0 – 500 μM mit einer Steigung von 0,89 pA/ μM ATP erreicht. Damit zeigte dieser Sensor im Vergleich zum im Rahmen dieser Arbeit entwickelten eine um den Faktor 57 verringerte Empfindlichkeit und ein um 23,5% erhöhtes Detektionslimit. Überlegen zeigte sich dieses System jedoch in Bezug auf die Lagerstabilität, da der Sensor über einen Zeitraum von sieben Tagen einsetzbar blieb. Möglicherweise war diese verbesserte Stabilität trotz einer auch in diesem Fall angewendeten Glutardialdehyd-Immobilisierung auf die zehnfach höhere BSA-Konzentration zurückzuführen, die zur Produktion des Sensors eingesetzt wurde und bewirkte, daß die Hexokinase in einer günstigen räumlichen Orientierung mit einem frei zugänglichen aktiven Zentrum an die Membran gebunden wurde.

Das zweite - von Scheller und Pfeiffer publizierte - GOD/HK-System bestand aus einer modifizierten Sauerstoffelektrode, mit der die aus der GOD-Reaktion resultierende O_2 -Anahme in An- und Abwesenheit von ATP bei –600 mV detektiert wurde. Beide Enzyme wurden hierzu in Polyacrylamid über Photopolymerisation immobilisiert. Das so erzeugte enzymhaltige Gel wurde anschließend zwischen zwei Membranen auf der Oberfläche der Sauerstoffelektrode fixiert. Der Sensor zeigte ein lineares Ansprechverhalten zwischen 0 – 1 mM ATP mit einem Detektionslimit von 200 μM . Über die Sensitivität und die Lagerstabilität der Bi-Enzymelektrode wurden keine Aussagen getroffen.

Verglichen mit diesen beiden Sensoren wurde mit der im Rahmen dieser Arbeit vorgestellten Bi-Enzymelektrode in Hinblick auf die Sensitivität und Nachweisgrenze ein deutlich verbessertes System entwickelt. Darüber hinaus wurde auch die Produktion des Sensors durch eine direkte Immobilisierung der beteiligten Enzyme auf der silanisierten Platinoberfläche erleichtert, so daß keine weitere, wie bei den anderen beiden Systemen nötige, Positionierung der Enzymschicht zwischen zunächst zwei Membranen und anschließend vor der Elektrode erforderlich war. Die entwickelte ATP-Elektrode ließ sich außerdem als Detektor in ein automatisiertes Fließinjektions-

Analysesystem mit einem Durchsatz von etwa 70 Proben/h integrieren. Die Analysenzeit von ca. 45 s wurde dabei größtenteils durch den Transport der Probe durch das Schlauchsystem bestimmt, die Detektion trug mit einer Ansprechzeit der Elektrode im Bereich von 1 – 2 s nur unwesentlich zu dieser Dauer bei. Bei den beiden in der Literatur beschriebenen ATP-Elektroden handelte es sich um Detektoren, die lediglich in Batch-Systemen einsetzbar waren, da sie eine Ansprechzeit von 2-3 min (Compagnone und Guilbault, 1997) bzw. 5–10 min (Scheller und Pfeiffer, 1980) bis zum Erreichen eines *steady states* besaßen, wodurch sich die Probenfrequenz deutlich reduzierte.

4.1.3 Beurteilung des ATP-Sensors gegenüber Verstärkungs- und Luciferase-systemen

Enzymatische Verstärkungssysteme

Enzymatische Verstärkungssysteme, die auf der optischen Detektion von NADH beruhen, das in einer dritten durch die Glucose-6-Phosphatdehydrogenase katalysierten Reaktion gebildet wurde, sind sowohl in Fließ- als auch in Batchsystemen eingesetzt worden (Hansen *et al.*, 1993; Schubert, 1993). Die von Schubert (1993) beschriebene Co-Immobilisierung der drei Enzyme auf einer Polyurethanmembran, die anschließend auf eine optische Faser aufgebracht wurde, führte im Batchsystem mit einer 90-fachen Verstärkung zu einem Detektionslimit von 0,1 μM , wobei der Sensor eine Ansprechzeit von 12 min benötigte. Hansen *et al.* (1993) nutzten dasselbe Enzymsystem zur ATP-Bestimmung im Durchfluß. Hexokinase, Pyruvatkinase und Glucose-6-Phosphatdehydrogenase wurden hierzu auf Glas-Beads immobilisiert, mit denen anschließend ein Kartuschenreaktor beschickt wurde. Als Detektor diente in dem FIA-System ein Durchfluß-Fluorometer, mit dem bei einer Fließrate von 0,33 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ oder einer Stoppzeit von 5 min eine Nachweisgrenze von 6 nM ATP erreicht wurde. Auch in Bezug auf die Lagerstabilität unterschieden sich diese beiden Systeme deutlich: während der Enzymreaktor über einen Zeitraum von zwei Monaten stabil blieb, verringerte sich die Sensitivität der Enzymmembran aufgrund der Deaktivierung der Pyruvatkinase bereits nach 48 h drastisch und wies damit eine mit der entwickelten Bi-Enzymelektrode vergleichbare Lagerstabilität auf.

Trotz der größeren Empfindlichkeit der Verstärkungssysteme weisen diese drei entscheidende Nachteile gegenüber dem GOD/HK-Sensor auf:

1. Der Einsatz von mindestens drei Enzymen wird nötig, was zu einem aufwendigeren Verfahren zur Optimierung der Reaktionsbedingungen führt.
2. Der Detektionsmechanismus erfordert den Zusatz des Coenzym NAD^+ , wodurch sich die Kosten pro Analyse deutlich erhöhen, da es innerhalb des Prozesses nicht wiedergewonnen werden kann und somit ständig neu zugeführt werden muß.
3. Liegen ATP und ADP, wie in Zellextrakten üblich, nebeneinander vor, ist das System nicht in der Lage, zwischen beiden zu differenzieren; das amplifizierte Detektorsignal setzt sich immer aus der Summe der beiden Adenosinphosphate zusammen.

Luciferase-Systeme

Die Luciferase-Reaktion stellt unter den enzymatischen ATP-Bestimmungsmethoden die empfindlichste dar. Allgemein gelten luminometrische Reaktionen als sehr sensitiv, da absolute Lichtmengen gemessen werden und keine Hintergrund verursachenden externen Lichtquellen benötigt werden.

Während der letzten beiden Jahrzehnte wurden intensiv Methoden zur Immobilisierung der Luciferase untersucht, um den finanziellen Aufwand, der mit der Verwendung des Enzyms in löslicher Form verbunden ist, zu minimieren. Hierzu wurde die Luciferase auf die Oberflächen verschiedener fester Träger wie z. B. Collagen (Blum *et al.*, 1985), Polyamid (Blum *et al.*, 1988) und Glas-Beads (Lee *et al.*, 1977) gekoppelt. Die Immobilisierung führte darüber hinaus auch zu einer Stabilisierung der Luciferase, so daß nach einer Lagerungsdauer von bis zu vier Monaten lediglich ein Aktivitätsverlust von 30% auftrat (Gautier *et al.*, 1990). Luciferase-Biosensoren wurden bereits sowohl in Batch- als auch in kontinuierlichen Fließsystemen eingesetzt (Blum *et al.*, 1985; Miller *et al.*, 1990), wobei mit 10 pM im Batchsystem ein höheres Detektionslimit als im Durchfluß (10 fM) erreicht wurde. Zusammenfassend ist die Luciferase-Reaktion gegenüber dem GOD/HK-System aus folgenden Gründen als besser zur ATP-Bestimmung geeignet einzustufen:

1. Über die Luciferase-Reaktion kann im Durchfluß eine bis um den Faktor 10^8 größere Empfindlichkeit erreicht werden.
2. Das immobilisierte Enzym weist eine verbesserte Lagerstabilität auf.

3. Durch Kopplung mit weiteren enzymatischen Reaktionen, kann das Luciferase-System auch zu einer sehr empfindlichen Detektion von ADP und AMP herangezogen werden (Hollnagel, 1998).

Obwohl sich diese optische Detektionsmethode - wie beschrieben - auch in Fließsystemen durchführen läßt, konnte dieses ATP-Bestimmungsverfahren jedoch nicht in das etablierte FIA-System integriert werden, da eine geeignete Durchflußküvette nicht zur Verfügung stand.

4.1.4 Beurteilung der Eignung des ATP-Systems zur Bioprozeßüberwachung

Das zentrale Problem der Bioprozeßüberwachung über eine *on-line* Bestimmung der intrazellulären ATP-Konzentration, stellt zur Zeit nicht das Detektionssystem, sondern viel mehr das Verfahren zur Extraktion des Nukleotids dar. Da intrazelluläre Nukleotid-Pools sehr schnelle Umsatzraten besitzen, muß die Extraktionsmethode praktisch sofort zu einer Inaktivierung aller enzymatischen Reaktionen führen, wodurch bereits strenge Bedingungen an die Art der Probenahme gestellt werden. Darüber hinaus muß sichergestellt sein, daß über dieses Verfahren alle niedermolekularen Substanzen quantitativ extrahiert und ausreichend hohe Wiederfindungsraten geliefert werden. Einer Extraktion mit Perchlorsäure (PCA) werden dabei die höchsten Ausbeuten zugeschrieben. Diese Methode erfordert neben der eigentlichen Extraktion aber noch weitere Schritte. Die sedimentierten Proteine müssen vom Überstand abgetrennt werden, dieser wiederum neutralisiert und filtriert werden, bevor die eigentliche Analyse der Probe beginnen kann. Die Automatisierung dieser zeitaufwendigen Probenvorbehandlung konnte bisher jedoch noch nicht realisiert werden. Die ATP-Detektion erfolgt daher *off-line* über HPLC/CE-Analytik. Eine *on-line* Analytik konnte bisher noch nicht etabliert werden, lediglich über die Expression von Luciferase in *E. coli* und Zugabe von Luciferin zum Medium, konnte die intrazelluläre ATP-Konzentration mit Hilfe einer in den Fermenter integrierten optischen Faser bestimmt werden (Lasko und Wang, 1996). Jedoch kann diese Methode nicht als allgemein gültiges Verfahren zur *on-line* ATP-Detektion betrachtet werden, da sie nur angewendet werden kann, wenn die DNA des entsprechenden *E. coli*-Stamms zuvor verändert wurde, so daß Luciferase vom Bakterium exprimiert wird, womit man kein allgemein einsetzbares Monitoring-System erhält. Darüber hinaus erhöht der Zusatz von Luciferin zum Medium den Kostenaufwand bei Fermentationen erheblich.

Die Entwicklung eines Systems zur Bioprozeßüberwachung erfordert somit zunächst eine Automatisierung der Probenahme und –aufbereitung. Die enzymatischen ATP-Sensoren weisen ausreichende Sensitivitäten auf, um intrazelluläre Konzentrationen bestimmen zu können. Der ATP-Gehalt einer einzelnen prokaryontischen Zelle liegt etwa im Bereich von 10^{-13} – 10^{-14} M ATP (Gamborg und Hansen, 1994). Das Luciferase- und auch die enzymatischen ATP-Verstärkungssystemen sollten unter der Voraussetzung, daß eine Diskriminierung zwischen ATP und ADP möglich ist, nach Entwicklung eines entsprechenden Interfaces zwischen Reaktor und Analysesystem zur Prozeßüberwachung einsetzbar sein. Für die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte GOD/HK-Elektrode gilt diese Aussage zunächst nur bedingt, da aufgrund der geringeren Empfindlichkeit, die ATP-Konzentration möglicherweise nicht über den gesamten Kultivierungsverlauf, sondern erst ab einer bestimmten Zellzahl detektiert werden kann.

4.2 Amperometrische XOD-Sensoren

Die Untersuchungen zur amperometrischen Xanthin-Detektion basierten auf der Reaktion der Xanthin-Oxidase. Aufgrund der elektrochemischen Eigenaktivität des Xanthins mußte dabei zunächst ein Meßmodus gefunden werden mit dem, möglichst ohne die Sensitivität des Nachweises zu verringern, dieses enzym-unabhängige Signal unterdrückt werden konnte. Die Charakterisierung der Biosensoren erfolgte wiederum im FIA-System.

4.2.1. XOD-Platinelektroden

Eine Unterdrückung der Xanthin-Direktoxidation konnte an Platinelektroden lediglich über eine Reduzierung des angelegten Potentials von 600 auf 300 mV erreicht werden. Das Aufbringen einer Diffusionsbarriere bestehend aus einer inerten BSA-UV-Membran verringerte zwar den direkten Xanthin-Umsatz an der Elektrode, unterband ihn jedoch nicht vollständig, um bei einem für die H_2O_2 -Oxidation optimalen Potential von 600 mV messen zu können.

Die Xanthin-Sensoren wurden nach dem unter 2.2.3.2 beschriebenen Prinzip über UV-Polymerisation hergestellt. Die Vermischung der Enzymlösung mit der Paste führte bei der Injektion einer 1 mM Xanthin-Lösung zu einem Signal von 51 nA, das sich innerhalb von 2,5 Stunden (100 Injektionen) um 45% verringerte. Der Zusatz von

Supplementen, die sich in vorherigen Untersuchungen zur Stabilisierung der Glucose- und Lactatoxidase als geeignet erwiesen hatten (Rohm, 1996; Schumacher *et al.*, 1999) beeinflusste sowohl die Stabilität als auch die Aktivität der immobilisierten XOD. Aufgrund der unbekannten Enzymstruktur lassen sich konkrete Wechselwirkungen mit den einzelnen Additiven nicht belegen, jedoch weisen die erzielten Ergebnisse darauf hin, daß die Diffusion des negativ geladenen Xanthins durch kationische Zusätze begünstigt wurde. Möglicherweise wurde die XOD mit einem isoelektrischen Punkt von 5,35 (Jakube, 1976) bei pH 8 auch besser durch positiv geladene Zusätze vor der denaturierenden UV-Strahlung abgeschirmt, so daß eine größere Menge aktiven Enzyms in der Membran verblieb, die erhöhte Stromstärken gewährleistete. Darüber hinaus ist auch bekannt, daß Additive mit tertiären Aminogruppen in den radikalischen Polymerisierungsprozeß einbezogen werden (Marabu Produktinformation) und sich somit unter Einfluß der UV-Strahlung verändern können, wodurch sich die Komplexität der möglichen Wechselwirkungen in der Paste weiter erhöht und die Interpretation der Daten zusätzlich erschwert.

Zusammenfassend betrachtet wurde die Sensoraktivität durch den Zusatz von positiv geladenen Additiven (Polylysin, DEAE-Dextran) als Einzelsubstanz oder in Kombination mit weiteren Supplementen gegenüber der reinen XOD-Elektrode um bis zu 165% (135 nA) erhöht. Durch die Aktivität der einzelnen Sensoren wurde indirekt auch ihre Stabilität beeinflusst, denn eine erhöhte H_2O_2 -Produktion führte zur Schädigung des Enzyms. Die Elektrode mit dem negativ geladenen BSA-Zusatz zeigte daher mit 68% nach 100 Injektionen (2,5 h Meßdauer) die größte verbleibende Stabilität. Allgemein konnte über dieses Immobilisierungsverfahren jedoch kein Sensor mit ausreichender Stabilität und Sensitivität erhalten werden, um Xanthin im relevanten Konzentrationsbereich (5 bis 270 μM) bestimmen zu können.

4.2.2 XOD-Graphitelektroden

Nach Platin wurde Graphit als zweites Elektrodenmaterial zur amperometrischen Xanthin-Bestimmung untersucht, wobei die XOD kovalent über die EDC-Methode (Kap. 2.2.3.3) immobilisiert wurde. Auch in diesem Fall konnte das enzym-unabhängige Xanthin-Signal nicht allein durch Aufbringen einer Diffusionsbarriere unterdrückt werden. Wie schon am Platin beobachtet, mußte auch hier das Potential von +600 mV auf +400 mV abgesenkt werden. Der Einsatz von Kaliumhexacyanoferrat als Mediator bzw. als Aktivierungsreagenz der Elektrodenoberfläche bewirkte eine

Redoxreaktion zwischen $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ und Xanthin, mit einer anschließenden Regeneration des Mediators. Durch das geringere Standardpotential der $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ -Oxidation führte die elektrochemische Aktivierung der Elektrodenoberfläche im Vergleich zur Xanthin-Reaktion zu einer Signalerhöhung. Jedoch betrug die Sensitivität der resultierenden Sensoren trotz der vorgeschalteten elektrochemischen Aktivierung nur 64 nA/mM Xanthin, darüber hinaus verringerte sich das Signal innerhalb von 2,5 Stunden (100 Injektionen) um 38%, so daß die XOD-Graphitelektroden die für eine Xanthin-Realproben-Bestimmung erforderlichen Sensor-Kriterien nicht erfüllte.

4.2.3 XOD-Reaktoren

Der Einsatz von XOD-Reaktoren erlaubte einen veränderten Meßablauf. Aufgrund der Erweiterung des FIA-Systems auf einen Zwei-Kanal-Modus wurde das Signal aus der spezifischen Xanthin-Umsetzung durch die XOD nicht länger über eine vollständige Unterdrückung der enzym-unabhängigen Oxidation ermittelt. Der Zwei-Kanal-Modus mit einer Platin-Dickschichtelektrode als Detektor wurde ausgenutzt, um mit der ersten Probeninjektion, die über einen XOD-Reaktor geleitet wurde, das Gesamtsignal (Xanthin-Direkt- + H_2O_2 -Oxidation) zu detektieren. Die Probe wurde anschließend ein zweites Mal injiziert und zur Bestimmung des XOD-unabhängigen Signalanteils über einen in den Fließweg 2 integrierten BSA-Reaktor dirigiert. Der spezifische Signalanteil wurde anschließend über Differenzbildung ermittelt.

Die Untersuchung geeigneter Trägermaterialien und Immobilisierungsmethoden zeigte, daß Xanthin-Oxidase am effektivsten über Glutardialdehyd auf APTS-silanierte poröse Glas-Beads gekoppelt werden konnte, wobei die Effizienz der Kopplung mit zunehmender Porengröße stieg. Der prozentuale Anteil des XOD-unabhängigen Signals am Gesamtsignal wurde durch die Art der Detektorvorbehandlung bestimmt. Die geringsten unspezifischen Signalanteile wurden durch eine Silanisierung der Platinelektrode erreicht. Mit Hilfe dieses Verfahrens wurde ähnlich wie bei der Herstellung eines Sol-Gels, eine dünne poröse Silicatschicht zum Schutz des darunter liegenden Platins erzeugt. Aufgrund der unterschiedlichen Molekülgrößen wurde Xanthin durch diese Membran wesentlich effektiver als H_2O_2 abgeschirmt, so daß sich der enzym-unabhängige Signalanteil im Vergleich zu einer

unbehandelten Elektrode (50-63%) in Abhängigkeit von der Xanthin-Konzentration auf 21-36% reduzierte.

Mit den XOD-Reaktoren und dem Zusatz von 0,5 mM EDTA wurde mit 3 $\mu\text{A}/\text{mM}$ in Bezug auf die Enzymelektrode eine deutlich verbesserte Sensitivität erreicht. Durch die Immobilisierung der XOD über Glutardialdehyd verbesserte sich auch die Stabilität, nach 100 Injektionen (6,66 Stunden) nahm das Signal lediglich um 9,6 % ab. In Puffer bei 4°C gelagert konnten die Reaktoren auch noch nach über sechs Wochen mit einem Aktivitätsverlust von lediglich 17,3% zur Xanthin-Bestimmung eingesetzt werden.

Der Einsatz der entwickelten XOD-Reaktoren in einem FIA-System mit Probeneintrag über ein konventionelles Injektionsventil führte bei Xanthin-Standards, die im Fermentationsmedium angesetzt waren, zu einer 41%igen Sensitivitätsabnahme, die mit 2,02 $\mu\text{A}/\text{mM}$ Xanthin jedoch ausreichend hoch blieb, um Realproben vermessen zu können. Die mit diesem System durchgeführte Analyse von acht Fermentationsproben aus einer *E. coli* Hochzell-dichte-Kultivierung führte zu einem Xanthin-Konzentrationsverlauf, der in sehr guter Übereinstimmung mit in der Literatur beschriebenen Ergebnissen stand (Rinas *et al.*, 1995). Eine Beurteilung der Qualität der ermittelten absoluten Werte konnte aufgrund der nicht zur Verfügung stehenden HPLC-Referenzanalytik nicht vorgenommen werden. Da bei der Überwachung einer Kultivierung über Xanthin-Bestimmung die verschiedenen Wachstumsphasen jedoch nicht über absolute, sondern über relative an- und absteigende extrazelluläre Xanthin-Konzentrationen charakterisiert werden, ist dieses System für diese Applikation als sehr gut geeignet einzustufen.

Auch mit einer veränderten Probenahmeinheit (Dialysem modul), über die eine Ankopplung des FIA-Systems an einen Fermenter simuliert wurde, konnten Realproben analysiert werden. Mit einer Akzeptorstrom-Stoppzeit von 5 min wurde in HDF-Medium ein von 0 – 1000 μM reichender linearer Meßbereich erhalten, über den gewährleistet blieb, daß alle Proben unverdünnt vermessen werden konnten. Im Vergleich der beiden Methoden zum Probeneintrag in das FIA-System ist das Dialysem modul daher trotz einer verringerten Empfindlichkeit als besser geeignet zu beurteilen. Wie die Ergebnisse zeigten, kam es bei der direkten Injektion von zu stark konzentrierten Proben zu Ablagerungen hochmolekularer Komponenten auf der Elektrodenoberfläche, durch die die Diffusion limitiert und im Vergleich zu ausreichend verdünnten Proben geringere Xanthin-Konzentrationen detektiert wurden.

Bei Verwendung des Dialysemoduls konnten diese hochmolekularen Bestandteile nicht in das Fließsystem gelangen und die Detektorsensitivität blieb unbeeinflusst. Mit Hilfe des Dialysemoduls, das praktisch als Tauchsonde in einen Fermenter integriert werden kann, wurde damit im Rahmen dieser Arbeit ein stabiles und *on-line* fähiges Analysesystem entwickelt, das eine sensitive Xanthin-Bestimmung ohne weitere Probenvorbehandlung gewährleistet.

4.2.4 Vergleichende Betrachtung mit weiteren Xanthin-Systemen

Aufgrund der durch die Xanthin-Direktoxidation verursachten Schwierigkeiten bei der Entwicklung eines amperometrischen Sensors, sind in der Literatur verschiedene Ansätze zur Vermeidung dieser enzym-unabhängigen Signale beschrieben. So publizierten Hu und Liu (1997) eine modifizierte Carbonelektrode zur Messung der Abnahme der Sauerstoffkonzentration bei -680 mV. In Übereinstimmung mit den im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnissen zur Entwicklung eines Sensors auf Basis einer Graphit-Dickschichtelektrode, haben Ianniello *et al.* (1982) beobachtet, daß eine interferenzfreie Xanthin-Bestimmung mit $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ als Elektronenakzeptor bei einem angelegten Potential von $+300$ mV möglich ist. Aufgrund der Möglichkeit Graphit durch Vermischen mit Mediatoren relativ leicht modifizieren zu können, sind bereits auch andere Elektronenakzeptoren wie beispielsweise Ferrocen zum Einsatz gekommen, das eine Xanthin-Detektion an einer Graphit/Teflon-Elektrode bei $0,0$ V ermöglichte (Cayuela *et al.*, 1998).

Für die Umsetzung von Xanthin an Platin-Elektroden werden in der Literatur widersprüchliche Angaben gemacht. Während Haemmerli *et al.* (1990) nur ein sehr geringes bei $+650$ mV durch Xanthin-Direktoxidation verursachtes Interferenzsignal beobachteten, fanden Peng *et al.* (1996), daß Platin sich bei diesem Potential sowohl Xanthin als auch Harnsäure gegenüber als sensitiv erwies, was durch die hier präsentierten Ergebnisse unterstützt wurde.

Im Vergleich mit weiteren publizierten Xanthin-Elektroden zeigten die im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Systeme eine geringere Sensitivität und Stabilität. Mit Gold als Elektrodenmaterial erreichten Zhao *et al.*, (1996) eine etwa um den Faktor 500 ($39 \mu\text{A}/\text{mM}$) verbesserte Empfindlichkeit mit einem Detektionslimit von $20 \mu\text{M}$. Die Elektroden waren über einen Zeitraum von sieben Tagen mit einem Aktivitätsverlust von 70% noch einsetzbar. Eine Carbonpasten-Elektrode mit einer Empfindlichkeit

von 560 nA/mM Xanthin und einer Lagerstabilität von acht Tagen wurde von Gonzalez *et al.* (1991) veröffentlicht. Die ungenügende Stabilität und Sensitivität der entwickelten Dickschichtsensoren wurde daher nicht durch das Enzym selbst, sondern durch die gewählten Immobilisierungsmethoden verursacht, die sich als wenig effizient bzw. als die XOD zu stark schädigend herausgestellt haben. Über eine Glutardialdehyd-Quervernetzung konnte das Enzym in großer Aktivität an Glas-Beads gebunden werden, so daß Sensitivitäten von bis zu 3 μ A/mM und eine Lagerstabilität von bis zu sechs Wochen erreicht wurden. In Hinblick auf die Stabilität wurde dabei durch die Reaktor-Entwicklung eine deutliche Verbesserung gegenüber den bisher publizierten Daten erzielt. Die erreichte Sensitivität konnte im Vergleich zur XOD-Goldelektrode (Zhao *et al.*, 1996) zwar nicht erhöht werden, war für die Xanthin-Bestimmung in Fermentationsproben jedoch ausreichend hoch. Da in der Literatur weder XOD-Reaktoren noch Xanthin-Sensoren zur Bioprozeßüberwachung beschrieben sind, lassen sich die Eigenschaften der entwickelten Reaktoren und die Ergebnisse der Realprobenmessungen nicht im Vergleich zu anderen Systemen beurteilen.

4.3 Elektrophoretische Untersuchungen an Xanthin-haltigen Proben

Untersuchungen zur Xanthin-Bestimmung über Kapillarelektrophorese wurden mit zwei verschiedenen Detektionsmethoden durchgeführt. Über die konventionelle UV-Absorptionsdetektion konnte Xanthin innerhalb von 90 s bis zu einer Konzentration von 0,5 mg/l (2,87 μ M) auch in einer komplexen Matrix (simuliertes Medium) nachgewiesen werden. Aufgrund der Relevanz von Xanthin in der klinischen Diagnostik (s. Kap. 1.4.2) befassen sich die Mehrzahl der erschienenen Publikationen mit der Trennung der Nukleobase in Körperflüssigkeiten wie Urin (Bory *et al.*, 1996) oder Serum (Shihabi *et al.*, 1995), wobei vergleichbare Nachweisgrenzen erzielt wurden.

Die indirekte Laser-induzierte Fluoreszenz wurde hauptsächlich in Hinblick auf eine Übertragung der elektrophoretischen Trennung auf ein μ CE-System untersucht. Daher wurden ausschließlich grundlegende Experimente durchgeführt, die jedoch sofort zeigten, daß Xanthin auch mit Hilfe dieser Methode nachgewiesen werden kann. Im allgemeinen zeigte sich der bereits für die UV-Detektion verwendete Elektrolyt und die angelegte Hochspannung auch für diesen Modus geeignet. Die größten Xanthin-Peakhöhen wurden dabei mit einem Fluorescein-Zusatz von 50 μ M,

einer Elektrolyt-Ionenstärke von 5 mM und einer angelegten Spannung von 15 kV erzielt.

Wie die elektrophoretischen Trennungen mit anschließender UV-Detektion ergeben haben, wurden mit der konventionellen CE ausreichende Sensitivitäten erreicht, um Xanthin in Realproben bestimmen zu können. Da für diese Untersuchungsreihe leider keine Realproben zur Verfügung standen, konnte dies experimentell nicht mehr bewiesen werden. Für die *on-line* Bioprozeßüberwachung lassen sich kommerzielle CE-Instrumente jedoch nicht einsetzen, da sie aufgrund der angelegten Hochspannung sehr gut abgeschirmt sind und so keine Möglichkeit zu einer Ankopplung an einen Fermenter über eine Schlauchverbindung zulassen. Prinzipiell sollte sich eine Kombination von Reaktor und CE jedoch über den Aufbau eines nicht kommerziellen bzw. eines miniaturisierten Systems erreichen lassen.

4.4 Mikrofluide Systeme zur Xanthin-Bestimmung

Im Mittelpunkt dieser Untersuchungen stand die Entwicklung eines Xanthin-Assays in miniaturisierten Fließsystemen mit Hilfe alternativer Detektionsverfahren, da der im allgemeinen in Zusammenhang mit mikrofluiden Systemen eingesetzte Fluoreszenz-Nachweis aufgrund der optischen Eigenschaften der Nukleobase nicht ohne weiteres möglich war.

4.4.1 Mikro-Kapillarelektrophorese

Um zur Detektion eines Analyten wie Xanthin, der keine natürliche Eigenfluoreszenz besitzt, dieses Nachweisprinzip trotzdem im Anschluß an die elektrophoretische Trennung nutzen zu können, wurde der indirekte Fluoreszenz-Modus gewählt.

Unter optimierten Bedingungen (10 mM CE-Puffer, 1 μ M Fluorescein, 7 kV Separations-Spannung, 15 s Injektion) wurde ein Detektionslimit von 200 μ M Xanthin erreicht. Der indirekte Peak migrierte dabei nach etwa 10 – 12 s, was die Analysendauer gegenüber dem makro-System um etwa Faktor 10 reduzierte. Es konnte auch gezeigt werden, daß Xanthin neben Glucose, einem Hauptbestandteil des HDF-Mediums, detektierbar ist.

Allgemein wird die Trennleistung beim Übergang von einem konventionellen System auf ein miniaturisiertes CE-Format nicht signifikant beeinflusst. Im direkten LIF-Modus wurde on-Chip bereits ein Detektionslimit von 200 nM erreicht (Effenhauser *et al.*, 1993). Herabgesetzt wird die Effizienz lediglich durch das kleinere zur Verfügung stehende Detektionsvolumen, aus dem erhöhte (Konzentrations-) Nachweisgrenzen resultieren. In Zusammenhang mit μ CE-Systemen wurden Fluoreszenz-Detektionen jedoch bisher im direkten Modus ausgeführt, so daß zur Diskussion der über den indirekten Nachweis erzielten Ergebnisse keine Literaturdaten zur Verfügung stehen.

Mit konventionellen CE-Systemen wurden jedoch bereits verschiedene Trennungen mit indirekter LIF-Detektion durchgeführt, unter anderem wurden auch Nukleotide, allerdings kein Xanthin, über dieses Verfahren nachgewiesen (Gross und Yeung, 1989), wobei zur Detektion ein Laser mit einer von den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen abweichenden anregenden Wellenlänge (331 nm) eingesetzt wurde. Als Fluorophor wählten die Autoren Salicylsäure, das aufgrund seiner guten Puffereigenschaften als Elektrolytlösung verwendet wurde, wodurch die Sensitivität erhöht und ein Detektionslimit von 200 nM erreicht wurde. Aufgrund der zur Verfügung stehenden Instrumente und eines zur Durchführung dieser Untersuchungen limitierten Zeitrahmens konnten für die μ CE-Trennung keine weiteren Optimierungen (z. B. Einsatz anderer Fluorophore, Veränderung des optischen Systems) durchgeführt werden.

4.4.2 Mikro-Fließsystem

Für diese Applikation wurde zunächst auf das identische Chip-Format (POCRE) zurückgegriffen, das schon für die CE-Trennung verwendet wurde, wodurch sich auch die universelle Einsetzbarkeit integrierter mikrofluider Systeme verdeutlichte. Über ein einfaches Spannungsprogramm wurden die für eine Xanthin-Chemilumineszenz-Detektion nötigen Enzym- und Reagenzlösungen im Chip vermischt. Um ein CL-Signal zu erhalten, mußte die Chip-Konfiguration für die beteiligten Reaktionspartner (Luminol, POD, H_2O_2 bzw. Xanthin/XOD) sowie die Detektorposition optimiert werden. Unter Einsatz von löslicher Peroxidase wurden für die reine CL-Reaktion die höchsten Signale mit 10 mM Luminol, 1 mM H_2O_2 und 2 mg/ml POD detektiert. Wurde die Wasserstoffperoxidlösung gegen eine Mischung aus Xanthin und XOD in Reservoir 4 ausgetauscht, verringerten sich die Emissionen um

81,8% (1 mM Xanthin/2 mg/ml XOD) bzw. 58% (1 mM Xanthin/10 mg/ml XOD), was auf eine zu geringe XOD-Enzymaktivität zurückzuführen war. Die Untersuchungen wurden bei pH 9 durchgeführt, da sich die Löslichkeit von Luminol im basischen Bereich verbessert, wodurch jedoch die Aktivität der XOD mit einem pH-Optimum von 7,5 (Barman, 1969) reduziert wurde. Um den Xanthin-Umsatz auch ohne eine weitere Erhöhung der eingesetzten Enzymmenge zu verbessern, wurden XOD und Xanthin für 10 min außerhalb des Chips vorinkubiert. Aufgrund einer schon bei den XOD-Elektroden beobachteten Schädigung des Enzyms bei höheren H_2O_2 -Konzentrationen, stieg das Signal jedoch nicht an, sondern reduzierte sich im Vergleich zur ohne Vorinkubation beobachteten Emission deutlich, daher wurde auf einen solchen Schritt im weiteren verzichtet. Das experimentelle Detektionslimit wurde bei Einsatz von löslicher POD und XOD mit 500 μM ermittelt.

Die Immobilisierung der POD führte zu keiner Verringerung des reinen CL-Signals, bei Austausch der H_2O_2 - gegen die Xanthin/XOD-Lösung wurden jedoch geringere Emissionen (42,3%) detektiert als mit der gelösten POD-Form, was möglicherweise durch eine Adsorption von migrierendem nicht umgesetzten Xanthin an die POD-Beads und einer damit verbundenen Deaktivierung des Enzyms verursacht wurde. Im umgekehrten Fall, bei Verwendung gelöster POD und immobilisierter XOD sanken die Signale auch bei einer Erhöhung der Xanthin-Konzentration auf 5 mM auf 5,3% ab. Diese Emissionsverringerung ließ sich auf eine ineffiziente XOD-Immobilisierung zurückführen, die sowohl durch die Bead- (5 μm) als auch durch die Porengröße (1000 Å) bedingt wurde. Ein Trägermaterial mit einem CPG-ähnlichen Durchmesser von etwa 150 μm (Kap. 3.2.3) konnte aufgrund der Kanalgeometrien nicht eingesetzt werden. Jedoch wurde, wie schon zu Beginn dieses Abschnitts erwähnt, mit dieser Anwendung die vielseitige Nutzbarkeit der integrierten mikrofluiden Systeme demonstriert. Über eine einfache Veränderung des Spannungsprogramms bzw. der -höhe konnte der POCRE-Chip sowohl für elektrophoretische Trennungen als auch als Fließsystem genutzt werden.

Ähnlich wie für den indirekten LIF-Detektionsmodus zählt auch die Chemilumineszenz-Messung zu einem Verfahren, das in Zusammenhang mit Mikrochips noch nicht ausreichend etabliert ist, so daß nur wenige vergleichende Literaturdaten zur Verfügung stehen. CL wurde bisher nur als Detektionsverfahren nach einer CE-Trennung eingesetzt, wobei es sich bei dem Analyten um einen POD-gelabelten Anti-

körper handelte (Mangru und Harrison, 1998). Das erzielte Detektionslimit war mit einem LIF-Nachweis vergleichbar, so daß im allgemeinen durch eine on-Chip CL-Detektion kein Sensitivitätsverlust auftritt.

4.4.2 Integrierter Enzymreaktor

Über den RCC-Chip wurde gewährleistet, daß die Enzymbeads im Kanalsystem zurückgehalten werden konnten und damit ein wiederverwertbares System entstand. Wie die Experimente im POCRE-Chip bereits gezeigt hatten, migrierten die Beads im elektrischen Feld und konnten daher innerhalb von etwa 10 min elektrokinetisch in die 330 μ l-Kavität gepackt werden. Zur Optimierung der reinen CL-Detektion wurde der Reaktor zunächst nur mit POD-Beads beschickt. Unter Verwendung von 10 mM Luminol und 1 mM H_2O_2 wurden mit dem Enzymreaktor CL-Emissionen beobachtet, die mit den im POCRE-Chip erzielten Signalhöhen vergleichbar waren. Aufgrund der größeren zur Verfügung stehenden Katalysatormenge führten auch geringere Konzentrationen als 10 mM Luminol/1 mM H_2O_2 zu deutlichen Signalen, so daß diese um den Faktor 10 reduziert wurden. Die Konzentrationsverringerung und Pufferspülschritte zwischen den einzelnen Messungen hatten darüber hinaus zur Folge, daß die immobilisierte POD nicht länger durch die Ablagerung eines braunen Reaktionsproduktes inaktiviert wurde, wodurch das CL-Signal innerhalb von vier Messungen um etwa 30% absank. Wurde das Peroxid gegen eine Xanthin/XOD-Lösung ausgetauscht, konnte wie bei einer Beladung des Reaktors mit POD- und XOD-Beads, keine Emission beobachtet werden. Die ausbleibende Lichtentstehung bei Einsatz immobilisierter XOD ließ sich mit der herabgesetzten Kopplungseffizienz, sowie über den vom pH-Optimum abweichenden pH-Wert erklären.

4.4.3 Beurteilung der Eignung mikrofluider Systeme zur Xanthin-Bestimmung

Zusammenfassend kann der Einsatz von Mikrosystemen zur Xanthin-Analytik als positiv bewertet werden. Trotz der limitierten Zeit, die zur Durchführung dieser Experimente zur Verfügung stand und daher nur grundlegende Untersuchungen zuließ, wurden vielversprechende Ergebnisse erzielt. Integrierte mikrofluide Systeme lassen sich auch mit zur direkten Standard-Fluoreszenz-Detektion alternativen Nachweismethoden nutzen, wobei das Kapillarnetzwerk neben dem eigentlichen Flüssigkeitstransport eine Vielzahl verschiedener anderer Funktionen (Injizieren,

Mischen, Separieren) übernehmen kann. Da es sich bei diesen Systemen, wie in Abb. 16 angedeutet, größtenteils noch um offene Laborsysteme handelt, die sich aus Komponenten zusammensetzen, die fest auf einem optischen Tisch installiert sind, und die vor allem eine unzureichende Abschirmung gegen die angelegte Hochspannung bieten, wurde eine mögliche Ankopplung der Mikrosysteme an die *Außenwelt*, wie z. B. einen Fermenter bisher noch nicht vorgenommen. Es wurde aber bereits gezeigt, daß Flüssigkeiten über peristaltische Pumpen in das Chip-Kapillarnetzwerk transportiert werden können (Attiya und Harrison, 1998). Ein Interface zu einem Reaktor sollte somit keine technologische Schwierigkeit mehr darstellen und bei einer entsprechenden Weiterentwicklung zu einem tragbaren Gerät, sollten sich mikrofluide Systeme zur Bioprozeßüberwachung nutzen lassen. Es gibt bereits zahlreiche Bemühungen diese Laboraufbauten in Meßinstrumente zu *verwandeln* (z. B. durch Agilent Technologies oder Alberta Microelectronic Corporation), so daß diese Technologie einen größeren Anwenderkreis finden kann und neben den immer noch dominierenden elektrophoretischen Verfahren neue Einsatzgebiete erschlossen werden können.

5. Literatur

Atkinson, D.E.; Walton, G.M. (1967) Adenosine triphosphate conversion in metabolic regulation, *J. Biol. Chem.*, 242, 3239-3240

Attiya, S.M.; Harrison, D.J. (1998) Continuous sampling and electrophoretic elution for monitoring dynamic chemical events, *Pittcon '98 Abstract-Band*, Abstract 453

Barman, T.E. (1969) in: *Enzyme Handbook*, Vol. 1, Springer Verlag, Berlin

Barnabé, N.; Butler, M. (1998) The relationship between intracellular UDP-*N*-acetyl hexosamine nucleotide pool and monoclonal antibody production in a mouse hybridoma, *J. Biotechnol.*, 60, 67-80

Barrette, W.C.; Hannum, D.M.; Wheeler, W.D.; Hurst, J.K. (1988) Viability and metabolic capability are maintained by *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Streptococcus lactis* at very low adenylate energy charge, *J. Bacteriol.*, 170, 3655-3659

Becker, H.; Dietz, W.; Dannberg, P. (1998) Microfluidic Manifolds by Hot Embossing for μ -TAS Applications, in: *Micro Total Analysis Systems '98*, Proceedings of the μ TAS '98 Workshop, Hrsg.: D.J. Harrison, A. van den Berg, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 253-256

Beckers, J.L. (1994) System peaks and disturbances to the baseline UV signal in capillary zone electrophoresis, *J. Chromatogr. A*, 662, 153-166

Behlke, J.; Heidrich, K.; Naumann, M.; Müller, E.-C.; Otto, A.; Reuter, R.; Kriegel, T. (1998) Hexokinase 2 from *Saccharomyces cerevisiae*: Regulation of Oligomeric Structure by in Vivo Phosphorylation at Serine-14, *Biochemistry*, 37, 11989-11995

Bhattacharya, M.; Fuhrman, L.; Ingram, A.; Nickerson, K.W.; Conway, T. (1995) Single-Run Separation and Detection of Multiple Metabolic Intermediates by Anion-Exchange High-Performance Liquid Chromatography and Application to Cell Pool Extracts Prepared from *Escherichia coli*, *Anal. Biochem.*, 232, 98-106

Bilitewski, U. (1995) Kombination von enzymatischen und immunologischen Einzeltests zu Testsystemen, Interpretation der Daten auf der Grundlage der biochemischen Zusammenhänge und Fertigung der enzymatischen Systeme in Siebdrucktechnik, Habilitationsschrift, Braunschweig

Bilitewski, U.; Rohm, I. (1997) Biosensors for Process Monitoring, in: *Handbook of Biosensors and Electronic Noses: Medicine, Food, and the Environment*, Hrsg.: Kress-Rogers, E., CRC Press Inc., New York, 435-468

Blum, L.J.; Coulet, P.R.; Gautheron, D.C. (1985) Collagen Strip with Immobilized Luciferase for ATP Bioluminescent Determination, *Biotechnology & Bioengineering*, 27, 232-237

Blum, L.J.; Gautier, S.M.; Coulet, P.R. (1993) Design of bioluminescence-based fiber optic sensors for flow-injection analysis, *J. Biotechnol.*, 31, 257-368

Blum, L.J.; Gautier, S.M.; Coulet, R.P. (1988) Luminescence fiber-optic biosensor, *Anal. Lett.*, 21, 717-726

Bory, C.; Chantin, C.; Boulieu, R. (1996) Comparison of capillary electrophoretic and liquid chromatographic determination of hypoxanthine and xanthine for the diagnosis of xanthinuria, *J. Chromatogr. A*, 730, 329-331

Büntemeyer, H.; Lütkemeyer, D.; Lehmann, J. (1991) Optimization of a serum-free fermentation processes for antibody production, *Cytotechnology*, 5, 57-67

Büttgenbach, S. (1991) *Mikromechanik*, Teubner Verlag, Stuttgart

Camman, K. ; Lemke, U., Rohen, A.; Sander, J.; Wilke, H; Winter, B. (1991) Chemo- und Biosensoren - Grundlagen und Anwendungen, *Angew. Chem.*, 103, 519-541

Cayuela, G.; Peña, N.; Reviejo, A.J.; Pingarrón, J.M. (1998) Development of a bienzymic graphite-teflon composite electrode for the determination of hypoxanthine in fish, *Analyst*, 123, 371-377

Chapman, A.G.; Atkinson, D.E. (1977) Adenine nucleotide concentrations and turnover rates. Their correlation with biological activity in bacteria and yeast, *Adv. Microb. Physiol.*, 15, 253-306

Chapman, A.G.; Fall, L.; Atkinson, D.E. (1971) Adenylate energy charge in *Escherichia coli* during growth and starvation, *J. Bacteriol.*, 108, 1072-1086

Chemnitius, G.-C. (1994) *Amperometrische Multienzym-Biosensoren zur Fischfrischebestimmung*, Dissertation, TU Braunschweig

Chen, D.Y. ; Aldelhelm, K.; Chen, X.L.; Dovichi, N.J. (1994) A simple laser-induced fluorescence detector for sulfarhodamine 101 in a capillary electrophoresis system: detection limits of 10 yoctomoles or six molecules, *Analyst*, 119, 349-352

Cheng, J.; Sheldon, E.L.; Wu, L.; Uribe, A.; Gerrue, L.O.; Carrino, J.; Heller, M.J.; O'Connell, J.P. (1998) Preparation and hybridization analysis of DNA/RNA from *E. coli* on microfabricated bioelectronic chips, *Nature Biotechnology*, 16, 541-546

Chiem, N., Harrison, D.J. (1997) Microchip-Based Capillary Electrophoresis for Immunoassays: Analysis of Monoclonal Antibodies and Theophylline, *Anal. Chem.* 69, 373-378

Cifuentes, A.; Poppe, H. (1995) Capillary electrophoresis of peptides using rectangular and cylindrical geometries: a comparative study, *Electrophoresis*, 16, 2051-2059

Cohn, W.E. (1949) The separation of purine and pyrimidine bases and of nucleotides by ion exchange, *Science*, 109, 377-378

Colowick, S.P. (1973) The hexokinase, in: The enzymes, 3. Auflage (Hrsg.: Boyer, P.D.) Vol. 9, Academic Press, New York, 1-48

Colyer, C.L., Mangru, S.D.; Harrison, D.J. (1997) Microchip-based capillary electrophoresis of human serum proteins, *J. Chromatogr. A*, 781, 271-276

Compagnone, D.; Guilbault, G.G. (1997) Glucose oxidase/hexokinase electrode for the determination of ATP, *Anal. Chim. Acta*, 340, 109-113

Csöregi, E.; Gorton, L.; Marko-Varga, G. (1993) Carbon fibres as electrode materials for the construction of peroxidase-modified amperometric biosensors, *Anal. Chim. Acta*, 273, 59-70

Culbertson, C.T.; Jacobson, S.C.; Ramsey, J.M. (1998) Dispersion sources for compact geometries on microchips, *Anal. Chem.*, 70, 3781-3789

Desbène, A.M.; Morin, C.J.; Mofaddel, N.L.; Groult, R.S. (1995) Utilization of fluorescein salt in laser-induced indirect fluorimetric detection II. Application to organic anions, *J. Chromatogr. A*, 716, 279-290

Di Piero, D.; Tavazzi, B.; Perno, C.F.; Bartolini, M.; Balestra, E.; Calì, R.; Giardina, B.; Lazzarino, G. (1995) An ion-pairing high-performance liquid chromatographic method for the direct simultaneous determination of nucleotides, desoxynucleotides, nicotinic coenzymes, oxypurines, nucleosides, and bases in perchloric acid cell extracts, *Anal. Biochem.*, 231, 407-412

Duffy, D.C.; McDonald, J.C.; Schueller, O.J.A.; Whitesides, G.M. (1998) Rapid Prototyping of Microfluidic Systems in Poly(dimethylsiloxane), *Anal. Chem.*, 70, 4974-4984

Effenhauser, C.S.; Bruin, G.J.M.; Paulus, A.; Ehrat, M. (1997) Integrated Capillary Electrophoresis on Flexible Silicone Microdevices: Analysis of DNA and Restriction Fragments and Detection of Single DNA Molecules on Microchips, *Anal. Chem.*, 69, 3451-3457

Effenhauser, C.S.; Manz, A.; Widmer, H.M. (1993) Glass chips for high-speed capillary electrophoresis separations with submicrometer plate heights, *Anal. Chem.*, 65, 2637-2642

Engelhardt, H. (1991) in Tagungsband zu den 11. Königssteiner Chromatographietagen 1991, GIT-Verlag Darmstadt

Fan, Z.H.; Harrison, D.J. (1994) Micromachining of capillary electrophoresis injectors and separators on glass chips and evaluation of flow at capillary intersections, *Anal. Chem.*, 66, 177-184

Fluka (1999) Fluka-Katalog 1999/2000

Fodor, S.P.A.; Rava, R.P.; Huang, X.C.; Pease, A.C.; Holmes, C.P.; Adams, C.L. (1993) Multiplexed biochemical assays with biological chips, *Nature*, 364, 555-556

Fromherz, P.; Offenhauser, A.; Vetter, T.; Weis, J. (1991) A Neuron-Silicon Junction: A Retzius Cell of the Leech on an Insulated-Gate Field-Effect Transistor, *Science*, 252, 1290-1292

Furman, T.C.; Neet, K.E. (1983) Association equilibria and reacting enzyme gel filtration of yeast hexokinase, *J. Biol. Chem.*, 258, S. 4930-4936

Gamborg, G.; Hansen, E.H. (1994) Flow-injection bioluminescent determination of ATP based on the use of the luciferin-luciferase system, *Anal. Chim. Acta*, 285, 321-328

Gautier, S.M.; Blum, L.J.; Coulet, R.P. (1990) Multi-function fibre-optic sensor for the bioluminescent flow determination of ATP or NADH, *Anal. Chim. Acta*, 235, 243-253

Goffeau, A. (1997) Molecular fish on chips, *Nature*, 385, 202-203

Gonzalez, E.; Pariente, F.; Lorenzo, E.; Hernandez, L. (1991) Amperometric sensor for hypoxanthine and xanthine based on the detection of uric acid, *Anal. Chim. Acta*, 242, 267-273

Gross, L.; Yeung, E.S. (1989) Indirect fluorimetric detection and quantification in capillary zone electrophoresis of inorganic anions and nucleotides, *J. Chromatogr.*, 480, 169-178

Haemmerli, S.D.; Suleiman, A.A.; Guilbault, G.G. (1990) Amperometric determination of hypoxanthine and inosine by use of enzyme sensors based on a clark-type hydrogen peroxide or oxygen electrode, *Anal. Lett.*, 23, 577-588

Hamann, C.H.; Vielstich, W. (1998) *Elektrochemie*, Wiley-VCH Verlag, Weinheim

Hansen, E.H.; Gundstrup, M.; Mikkelsen, H.S. (1993) Determination of minute amounts of ATP by flow injection analysis using enzyme amplification reactions and fluorescence detection, *J. Biotechnol.* 31, 369-380

Harrison, D.J.; Fluri, K.; Seiler, K.; Fan, Z.; Effenhauser, C.S.; Manz, A. (1993) Micromachining a Miniaturized Capillary Electrophoresis-Based Chemical Analysis System on a Chip, *Science*, 263, 895-897

Harrison, D.J.; Manz, A.; Fan, Z.; Lüdi, H.; Widmer, H.M. (1992) Capillary Electrophoresis and Sample Injection Systems Integrated on a Planar Glass Chip, *Anal. Chem.*, 64, 1926-1932

Harrison, D.J.; van den Berg, A; Hrsg. (1998) *Micro Total Analysis Systems '98*, Proceedings of the μ TAS '98 Workshop, Banff, Canada, Kluwer Academic, Publishers, Dordrecht

Hille, R. (1994) The reaction mechanism of oxomolybdenum enzymes, *Biochimica Biophysica Acta*, 1184, 143-169

Hjertén, S. (1967) Free zone electrophoresis, *Chromatog. Rev.*, 9, 122-219

Hoffman, N.E.; Liao, J.C. (1977) Reversed phase high performance liquid chromatographic separations of nucleotides in the presence of solvophobic ions, *Anal. Chem.*, 49, 2231-2234

Hollnagel, H.M. (1998) Luminometrische Bestimmung von ATP, ADP und AMP mittels eines Drei-Enzym-Systems, Wissenschaftliche Abschlußarbeit, TU Braunschweig

Hu, S.; Liu, C.-C. (1997) Development of a hypoxanthine biosensor based on immobilized xanthine oxidase chemically modified electrode, *Electroanalysis*, 9, 372-377

Huang, Y.-M.; Whang, C.-W. (1998) Capillary electrophoresis of arsenic compounds with indirect fluorescence detection, *Electrophoresis*, 19, 2140-2144

Ianniello, R.M.; Lindsay, T.J.; Yacynych, A.M. (1982) Immobilized xanthine oxidase chemically modified electrode as a dual analytical sensor, *Anal. Chem.*, 54, 1980-1984

Ikariyama, Y.; Aizawa, M.; Suzuki, S. (1980) Analytical use of a biochemical luminous membrane, *J. Solid-Phase Biochem.*, 5, 223-233

Jacobson, S.C.; Hergenröder, R.; Koutny, L.B.; Ramsey, J.M. (1994) Open Channel Electrochromatography on a Microchip, *Anal. Chem.*, 66, 2369-2373

Jakube, H.D. (1976) Brockhaus ABC Biochemie, Hrsg.: C.M. Eulitz, Brockhaus Verlag, Leipzig

Jorgenson, J.W.; Lukacs, K.D. (1981) Zone electrophoresis in open tubular glass capillaries, *Anal. Chem.*, 53, 1298-1302

Juengling, E.; Kammermeier, H. (1980) Rapid assay of adenine nucleotides or creatine compounds in extracts of cardiac tissue by paired-ion reverse-phase high-performance liquid chromatography, *Anal. Biochem.*, 102, 358-361

Kaplan, R.; Cohen, L.; Yagil, E. (1975) Acid-soluble degradation products of ribonucleic acid in *Escherichia coli* and the role of nucleotidases in their catabolism, *J. Bacteriol.*, 124, 1159-1164

Kawamoto, Y.; Shinozuka, K.; Kunitomomo, M.; Haginaka, J. (1998) Determination of ATP and Its Metabolites Released from Rat Caudal Artery by Isocratic Ion-Pair Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography, *Anal. Biochem.*, 262, 33-38

Khandurina, J.; Jacobson, S.C.; Waters, L.C.; Foote, R.S.; Ramsey, J.M. (1999) Microfabricated Porous Membrane Structure for Sample Concentration and Electrophoretic Analysis, *Anal. Chem.*, 71, 1815-1819

Kohen, A.; Jonsson, T.; Klinman, J.P. (1997) Effects of Protein Glycosylation on Catalysis: Changes in Hydrogen Tunneling and Enthalpy of Activation in the Glucose oxidase Reaction, *Biochemistry*, 36, 2603-2611

Koolman, J.; Röhm, K.-H. (1994) Taschenatlas der Biochemie, Georg Thieme Verlag Stuttgart New York

Kooyman, R.P.H.; Lechuga, L.M. (1997) Immunosensors based on Total Internal Reflectance, in: Handbook of Biosensors and Electronic Noses: Medicine, Food, and the Environment, Hrsg.: Kress-Rogers, E., CRC Press Inc., New York, 169-196

Kopetzki, E.; Entian, K.-D.; Mecke, D. (1985) Complete nucleotide sequence of the hexokinase PI gene (HXK1) of *Saccharomyces cerevisiae*, Gene, 39, 95-102

Kopp, M.U.; de Mello, A.J.; Manz, A. (1998) Chemical Amplification: Continuous-Flow PCR on a Chip, Science, 280, 1046-1048

Korman, M.; Vindevogel, J.; Sandra, P. (1994) Application of micellar electrokinetic chromatography to the quality control of pharmaceutical formulations: The analysis of xanthine derivatives, Electrophoresis, 15, 1304-1309

Kuhr, W. G. (1999) persönliche Mitteilung

Kuhr, W.G.; Yeung, E.S. (1988) Optimization of sensitivity and separation in capillary electrophoresis with indirect fluorescence detection, Anal. Chem., 60, 2642-2646

Lasko, D.R.; Wang, D.I.C. (1996) On-line Monitoring of Intracellular ATP Concentration in *Escherichia coli* Fermentations, Biotechnology & Bioengineering, 52, 364-372

Lawrence, C.R.; Geddes, N.J. (1997) Surface Plasmon Resonance (SPR) for Biosensing, in: Handbook of Biosensors and Electronic Noses: Medicine, Food, and the Environment, Hrsg.: Kress-Rogers, E., CRC Press Inc., New York, 149-168

Lee, Y.; Jablonski, I.; DeLuca, M. (1977) Immobilization of firefly luciferase on glass rods: Properties of the immobilized enzyme, Anal. Biochem, 80, 496-501

Li, J.; Thibault, P. Bings, N.H.; Skinner, C.D.; Wang, C.; Colyer, C., Harrison, D.J. (1999) Integration of Microfabricated Devices to Capillary Electrophoresis-Electrospray Mass Spectrometry Using a Low Dead Volume Connection: Application to Rapid Analysis of Proteolytic Digests, Anal. Chem., 71, 3036-3045

Liang, Z.; Chiem, N.; Ocivirk, G.; Tang, T.; Fluri, K.; Harrison, D.J. (1996) Microfabrication of a planar absorbance and fluorescence cell for integrated capillary electrophoresis devices, Anal. Chem., 68, 1040-1046

Lin, H.; Xu, D.-K.; Chen, H.-Y. (1997) Simultaneous determination of purine bases, ribonucleosides and ribonucleotides by capillary electrophoresis-electrochemistry with a copper electrode, J. Chromatogr. A, 760, 227-233

Litt, M.R. ; Potter, J.J.; Mezey, E.; Mitchell, M.C. (1989) Analysis of pyridine dinucleotides in cultured rat hepatocytes by high-performance liquid chromatography, Anal. Biochem., 179, 34-36

Liu, Z.; Li, T.; Wang, E. (1995) Simultaneous Determination of Guanine, Uric Acid, Hypoxanthine and Xanthine in Human Plasma by Reversed-phase High-performance Liquid Chromatography With Amperometric Detection, *Analyst*, 120, 2181-2184

Macka, M.; Haddad, P.R.; Gebauer, P.; Bocek, P. (1997) System peaks in capillary zone electrophoresis 3. Practical rules for predicting the existence of system peaks in capillary zone electrophoresis of anions using indirect spectrophotometric detection, *Electrophoresis*, 18, 1998-2007

Mangru, S.D. (1997) Chemiluminescence in Microchip Separations, M.Sc. Thesis, University of Alberta, Edmonton, Kanada

Mangru, S.D.; Harrison, D.J. (1998) Chemiluminescence detection in integrated post-separation reactors for microchip-based capillary electrophoresis and affinity electrophoresis, *Electrophoresis*, 19, 2301-2307

Manz, A.; Harrison, D.J.; Verpoorte, E.; Fetting, J.C.; Paulus, A.; Lüdi, H.; Widmer, H.M. (1992) Planar chips technology for miniaturization and integration of separation techniques into monitoring systems: capillary electrophoresis on a chip, *J. Chromatogr.*, 593, 253-258

Marabu Produktinformation, Technische Information über UV-Siebdruck-technologie, Marabouwerke GmbH & Co, Tamm

McDonald, J.C.; Duffy, D.C.; Anderson, J.R.; Chiu, D.T.; Wu, H.; Schueller, O.J.A.; Whitesides, G.M. (2000) Fabrication of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane), *Electrophoresis*, 21, 27-40

Meyer, R.; Wagner, K.G. (1985) Nucleotide pools in suspension-cultured cells of *Datura innoxia*. I. Changes during growth of the batch culture, *Planta*, 166, 439-445

Mikkers, F.E.P.; Everaerts, F.M.; Verheggen, T.P.E.M. (1979) High performance zone electrophoresis, *J. Chromatogr.*, 169, 11-20

Miller, J.N.; Nawawi, M.B.; Burgess, C. (1992) Detection of bacterial ATP by reversed flow-injection analysis with luminescence detection, *Anal. Chim. Acta*, 266, 339-343

Mohns, J. (1996) Einsatz von Biosensoren in Kombination mit einer neuen Probenahmetechnik in der Prozeßüberwachung und Lebensmittelanalytik, TU Braunschweig,

Mulchandani, A.; Bassi, A.S. (1995) Principles and applications of biosensors for bioprocess monitoring and control, *Critical Reviews in Biotechnology*, 15, 105-124

Müller, O.; Hahnenberger, K.; Dittmann, M.; Yee, H.; Dubrow, R.; Nagle, R.; Ilsley, D. (2000) A microfluidic system for high-speed reproducible DNA sizing and quantitation, *Electrophoresis*, 21, 128-134

Müller, T.; Gradl, G.; Howitz, S.; Shirley, S.; Schnelle, Th.; Fuhr, G. (1999) A 3-D microelectrode system for handling and caging single cells and particles, *Biosensors & Bioelectronics*, 14, 247-256

Ocvirk, G.; Verpoorte, E.; Manz, A.; Grasserbauer, M.; Widmer, H.M. (1995) High performance liquid chromatography partially integrated onto a silicon chip *Anal. Methods Instrum.*, 2, 74-82

Oda, R.P.; Landers, J.P. (1997) Introduction to Capillary Electrophoresis, in: *Handbook of Capillary Electrophoresis*, Ed. Landers, J.P., CRC Press, Boca Raton, Chapter 1

Oleschuk, R.D.; Shultz-Lockyear, L.L.; Ning, Y.; Harrison, D.J. (2000) Trapping of Bead Based Reagents within Microfluidic Systems: On-chip Solid-Phase Extraction and Electrochromatography, *Anal. Chem.*, 72, 585-590

Peng, T.-Z.; Yang, L.-J.; Shen, L.-Q. (1996) A sensitive xanthine oxidase electrode with silk net for estimating fish freshness, *Chinese J. Chemistry*, 14, 404-411

Pinto, D.M. ; Ning, Y.; Figeys, D. (2000) An enhanced microfluidic chip coupled to an electrospray Qstar mass spectrometer for protein identification, *Electrophoresis*, 21, 191-197

Plant, A.L.; Locascio-Brown, L.; Haller, W.; Durst, R.A. (1991) Immobilization of binding proteins on nonporous supports. Comparison of protein loading, activity, and stability, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 30, 83-98

Pons, M.-N. (1991) *Bioprocess Monitoring and Control*; Hanser publishers, Munich, Vienna, New York, Barcelona

Poppe, H. (1992) Overloading and Interaction Phenomena in Electrophoretic Separation, *Anal. Chem.*, 64, 1908-1919

Poquet, Y.; Constant, P.; Peyrat, M.A.; Poupot, R.; Halary, F.; Bonneville, M.; Fournié, J.J. (1996) High-pH-Exchange Chromatographic Analysis of Phosphorylated Compounds: Application to Isolation and Characterization of Nonpeptide Mycobacterial Antigens, *Anal. Biochem.*, 243, 119-126

Quiong, C.; Tuzhi, P.; Liju, Y. (1998) Silk fibroin/cellulose acetate membrane electrodes incorporating xanthine oxidase for the determination of fish freshness, *Anal. Chim. Acta*, 369, 245-251

Rastelli, G.; Costantino, L.; Albasini, A. (1997) A Model of the Interaction of Substrates and Inhibitors with Xanthine Oxidase, *J. Am. Chem. Soc.*, 119, 3007-3016

Raymond, D.E.; Manz, A.; Widmer, H.M. (1994) Continuous Sample Pretreatment Using a Free-Flow Electrophoresis Device Integrated onto a Silicon Chip, *Anal. Chem.*, 66, 2858-2865

Rehák, M.; Šnejdárková, M.; Otto, M. (1994) Application of biotin-streptavidin technology in developing a xanthine biosensor on a self assembled phospholipid membrane, *Biosensors & Bioelectronics*, 9, 337-341

Reichel, H. (1988) Hybridintegration Technologie und Entwurf von Dickschichtschaltungen, Dr. Alfred Hüthig Verlag, Heidelberg

Rinas, U. (1998) persönliche Mitteilung

Rinas, U.; Hellmuth, K.; Kang, R.; Seeger, A.; Schlieker, H. (1995) Entry of *Escherichia coli* into stationary phase is indicated by endogenous and exogenous accumulation of nucleobases, *Appl. Environ. Microbiol.*, 61, 4147-4151

Roberts, M.A.; Rossier, J.S.; Bercier, P.; Girault, H. (1997) UV Laser Machined Polymer Substrates for the Development of Microdiagnostic Systems, *Anal. Chem.*, 69, 2035-2042

Rodríguez, I.; Lee, H.K.; Li, S.F.Y. (1999) Microchannel electrophoretic separation of biogenic amines by micellar electrokinetic chromatography, *Electrophoresis*, 20, 118-126

Rohm, I. (1996) Entwicklung amperometrischer Enzymsensoren in Siebdrucktechnik und ihr Einsatz mittels Mehrkanal-Fließinjektionsanalyse in der on-line Bioprozeßüberwachung, Dissertation, TU Braunschweig

Rossier, J.S.; Schwarz, A.; Reymond, F.; Ferrigno, R.; Bianchi, F.; Girault, H.H. (1999) Microchannel networks for electrophoretic separations, *Electrophoresis*, 20, 727-731

Ruzicka, J.; Hansen, E.H. (1975) Flow injection analysis. Part I. A new concept for fast continuous flow analysis, *Anal. Chim. Acta*, 78, 145-157

Ryll, T. (1992) Untersuchungen intrazellulärer Ribonukleotidpools tierischer Zellkulturen für die Kontrolle von Produktionsprozessen, Dissertation, Braunschweig

Ryll, T.; Wagner, R. (1992) Intracellular ribonucleotide pools as a tool for monitoring the physiological state of in vitro cultivated mammalian cells during processes, *Biotechnol. Bioeng.*, 40, 934-946

Scheller, F.; Pfeiffer, D. (1980) Glucose Oxidase-Hexokinase Bienzyme Electrode Sensor for Adenosine Triphosphate, *Anal. Chim. Acta*, 117, 383-386

Scheper, Th. (1991) Bioanalytik - Messung des Zellzustandes und der Zellumgebung in Bioreaktoren, Vieweg Verlag, Braunschweig

Schmid, R.D.; Gebbert, A.; Kindervater, R.; Krämer, P. (1991) Biosensoren zur Analytik von Pflanzenschutzmitteln in Wasser, *Z. Wasser-Abwasser-Forsch.*, 24, 15-20

Schmidt, A.; Rohm, I.; Rüger, P.; Weise, W.; Bilitewski, U. (1994) Application of screen printed electrodes in biochemical analysis, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 349, 607-612

Schubert, F. (1993) A fiber-optic enzyme sensor for the determination of adenosine diphosphate using internal analyte recycling, *Sensors Actuat. B*, 11, 531-535

Schumacher, J.T.; Münch, I.; Richter, T.; Rohm, I.; Bilitewski, U. (1999) Investigations with respect to stabilization of screen-printed enzyme electrodes, *J. Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 7, 67-76

Seeger, A. (1995) Produktion des basischen Fibroblastenwachstumsfaktor (bFGF) im Hochzelldichteverfahren mittels rekombinanter *Escherichia coli*, Dissertation, TU Braunschweig

Shihabi, Z.K.; Hinsdale, M.E.; Bleyer, A.J. (1995) Xanthine analysis in biological fluids by capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. B*, 669, 163-169

Shill, J.P.; Peters, B.A.; Neet, K.E. (1973) Monomer-dimer equilibria of yeast hexokinase during reacting enzyme sedimentation, *Biochemistry*, 13, 3864-3871

Simpson, P.C.; Roach, D.; Woolley, A.T.; Thorson, T.; Johnston, R.; Sensabaugh, G.F.; Mathies, R.A. (1998) High-throughput genetic analysis using microfabricated 96-sample capillary array electrophoresis microplates, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 2256-2261

Stiene, M. (1997) Elektrochemische Detektion von Virusinfektionen am Beispiel der Afrikanischen Schweinepest, Dissertation, TU Braunschweig

Stryer, L. (1990) Biochemie, Spektrum der Wissenschaft Verlagsgesellschaft, Heidelberg

Terry, S.C.; Jerman, J.H.; Angnell, J.B. (1979) A gas chromatographic air analyzer fabricated on a silicon wafer, *IEEE Trans. Electron. Devices*, ED-26, 1880-1886

Tseng, H.C.; Dadoo, R.; Zare, R.N. (1994) Selective determination of adenine-containing compounds by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection, *Anal. Biochem.*, 222, 55-58

Tsionsky, M.; Gun, G.; Glezer, V.; Lev, O. (1994) Sol-gel-derived ceramic-carbon composite electrodes: Introduction and scope of applications, *Anal. Chem.*, 66, 1747-1753

von Heeren, F.; Verpoorte, E.; Manz, A.; Thormann, W. (1996) Micellar electrokinetic chromatography separations and analysis of biological sample on a cyclic planar microstructure, *Anal. Chem.*, 68, 2044-2053

Wagner, G.; Guilbault, G.G.; Hrsg. (1994) Food Biosensor Analysis, Marcel Dekker Inc., New York

Wang, J. (1995) Electroanalysis and Biosensors, *Anal. Chem.*, 67, 487R-492R

Wei, H.; Wang, T.; Li, S.F.Y. (1997) Detection of underivatized carbohydrates in capillary electrophoresis with a bienzyme electrode, *Electrophoresis*, 18, 2024-2029

White, N.M. (1994) Thick film technology, in: *Handbook of Sensors and Actuators 1: Thick Film Sensors*, Ed.: Prudenziati, M., Elsevier, Amsterdam, 3-36

Wollenberger, U.; Schubert, F.; Scheller, F.W.; Danielson, B.; Mosbach, K. (1987) A biosensor for ADP with internal substrate amplification, *Anal. Lett.*, 20, 657-668

Woolley, A.T.; Lao, K.; Glazer, A.N.; Mathies, R.A. (1998) Capillary Electrophoresis Chips with Integrated Electrochemical Detection, *Anal. Chem.*, 70, 684-688

Xue, Q.; Yeung, E.S. (1995) Difference in the chemical reactivity of individual molecules of an enzyme, *Nature*, 373, 681-683

Yang, X.; Johansson, G.; Pfeiffer, D.; Scheller, F.W. (1991) Enzyme electrodes for ADP/ATP with Enhanced Sensitivity due to Chemical Amplification and Intermediate Accumulation, *Electroanalysis*, 3, 659-663

Yeung, E.S.; Kuhr, W.G. (1991) Indirect detection methods for capillary separations, *Anal. Chem.*, 63, 275A-282A

Yoshida, H.; Nishihara, H.; Kataoka, T. (1993) Adsorption of BSA on QAE-Dextran: Equilibria, *Biotechnology & Bioengineering*, 41, 280-286

Zhang, B.; Liu, H.; Karger, B.L.; Foret, F. (1999) Microfabricated Devices for Capillary Electrophoresis-electrospray Mass Spectrometry, *Anal. Chem.*, 71, 3258-3264

Zhao, J.; O'Daly, J.P.; Henkens, R.W.; Stonehuerner, J.; Crumbliss, A.L. (1996) A xanthine oxidase/colloidal gold enzyme electrode for amperometric biosensor applications, *Biosensors & Bioelectronics*, 11, 493-502